



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Caracterização do perfil clínico-epidemiológico de uma população com hanseníase na Bahia e avaliação de microRNAs (miRNAs) ligados à via dos TLRs e sua correlação com genes de morte celular em biópsias de pacientes com hanseníase.

Lucas de Oliveira Neves de Farias

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Caracterização do perfil clínico-epidemiológico de uma população com hanseníase na Bahia e avaliação de microRNAs (miRNAs) ligados à via dos TLRs e sua correlação com genes de morte celular em biópsias de pacientes com hanseníase.

Lucas de Oliveira Neves de Farias

Professora-orientadora: Dra. Léa Cristina Castellucci

Professor-coorientador: Dr. Paulo Roberto Lima Machado

Dissertação apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, na área de concentração em Imunogenética.

Salvador (Bahia), 2023

Ficha catalográfica
Bibliotheca Gonçalo Moniz
Sistema Universitário de Bibliotecas
Universidade Federal da Bahia

Farias, Lucas de Oliveira Neves de.

F224 Caracterização do perfil clínico-epidemiológico de uma população com hanseníase na Bahia e avaliação de microRNAs (miRNAs) ligados à via dos TLRs e sua correlação com genes de morte celular em biópsias de pacientes com hanseníase / Lucas de Oliveira Neves de Farias. – 2023.

122 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Léa Cristina Castellucci.
Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Lima Machado.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2023.

Inclui anexos.

1. MicroRNAs. 2. Genes. 3. Hanseníase – Bahia. I. Castellucci, Léa Cristina. II. Machado, Paulo Roberto Lima. III. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. IV. Título.

CDU (2007): 601.4

Elaboração (Resolução CFB nº 184/2017):
Solange Mattos, CRB-5/758

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

- 1) *Dr^a. Léa Cristina de Carvalho Castellucci* - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Feira de Santana (1997), Mestrado (2000) e Doutorado (2005) em Imunologia, com ênfase em Imunogenética, pela Universidade Federal da Bahia. Possui Pós-doutorado em Genética de Doenças Infecciosas pela Universidade de Cambridge, Inglaterra (2005-2007). Atualmente é pesquisadora associada do Serviço de Imunologia da Universidade Federal da Bahia, Professora e vice-coordenadora do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia. (Orientador/Presidente)
- 2) *Dr^a. Lukary Oliveira Takenami* - Possui Graduação em Biomedicina pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), Mestrado e Doutorado pela Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa (PgBSMI) do Instituto Gonçalo Moniz (IGM/Fiocruz). Desenvolveu atividades de pesquisa vinculada ao Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP) do Instituto Gonçalo Moniz (IGM). Atualmente é professora Adjunto A, nível 2, membro do Núcleo Docente Estruturante (NDE) do curso de graduação em Medicina da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), campus Paulo Afonso (Bahia) e do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos (CEP/UNIVASF). Integra o Grupo de Pesquisa Clínica Fiocruz em Tuberculose - Fiocruz e é vice-líder do Grupo de Pesquisa, Ensino e Cuidado em Saúde (GPECS/UNIVASF).
- 3) *Dr. Nicolaus Albert Borges Schriefer* - Graduação em Medicina (1990) e mestrado em Imunologia (1995) pela Universidade Federal da Bahia; doutorado em Imunologia pela Universidade de São Paulo (2000); treinamento em biologia molecular e epidemiologia molecular das doenças infecciosas pela Universidade de Cornell (1992-1995). Professor Associado de Parasitologia (graduação) e de Epidemiologia Molecular das Doenças Infecciosas (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) da Universidade Federal da Bahia. Professor visitante na Escola de Saúde Pública da Universidade da Califórnia - Berkeley com bolsa CAPES-PRINT (setembro /2021 a agosto 2022).

Membro Suplente:

- 4) *Dr^a Luciane Amorim Santos* - Graduada em Biomedicina pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Mestrado e Doutorado pelo curso de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz. Professora Adjunta da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública e Professora colaboradora do Programa de Pós-Graduação em Ciências de Saúde (PPgCS - UFBA). Atua em pesquisas nas áreas de Genômica, Biologia Molecular e Bioinformática de Doenças Infecciosas como retrovírus humanos (HIV e HTLV), arbovírus (ZIKV, CHIKV, WNV), *Leptospira* e *Leishmania*.

Sem a direção dada por Deus, a conclusão deste trabalho não seria possível. Por causa disso, dedico esta dissertação a Ele. Com muita gratidão no coração.

A Cruz Sagrada Seja Minha Luz.

Agradeço e dedico este trabalho aos meus pais, Maria da Conceição e José Raimundo (in Memoriam). Pelo carinho, afeto, dedicação e cuidado que meus pais me deram durante toda a minha existência. Os dois maiores incentivadores das realizações dos meus sonhos. Muito obrigado.

*Aos meus irmãos Silas e Thaís,
a minha sobrinha Lara por todo apoio.*

A Luan Amorim, pelo amor e carinho durante essa fase da minha vida.

E a todos que torceram e acreditaram em meu sucesso.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Dra. Léa Castellucci, por sua orientação, pela inestimável atenção, sua disponibilidade, e incentivo que foram fundamentais para realizar e prosseguir este estudo. Saliento o apoio incondicional prestado, a forma interessada, extraordinária e pertinente como acompanhou a realização deste trabalho. As suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso. Não posso esquecer a sua grande contribuição para o meu crescimento como pesquisador. Eternamente grato por todo o apoio. Por acreditar nesse projeto desde o início, pela paciência e respeito durante as orientações e pelo crescimento que me proporcionou durante esse período. Meus mais sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

Dr. Paulo Machado

Coordenador do Serviço de Imunologia (SIM), coorientador, Médico Dermatologista, pela disponibilidade e ajuda, por toda sua contribuição e apoio para este deste trabalho.

Ao Prof. Edgar Marcelino de Carvalho

Fundador do Serviço de Imunologia (SIM), pela oportunidade oferecida e fomento através do INCT-DT para a realização desse trabalho.

Dra. Tainã Lago

Colega do serviço de Imunologia pela paciência e ajuda durante as extrações de RNA, expressão genica e todos os outros experimentos, pelas tabelas e gráficos.

Dra. Nadja Lima

Colega do serviço de Imunologia por todo o conhecimento durante os ELISAS que fizemos e poder da continuidade ao trabalho que você desenvolveu.

Aos colegas e companheiros do grupo

Isaac Queiroz, Thailamar Vieira pelas importantes sugestões e ajuda que muito acrescentaram a essa pesquisa.

A toda equipe do Ambulatório Magalhães Neto e Instituto Couto Maia

Em especial a Dra. Rosângela Cunha, Dr. Thiago Amparo, equipe de médicos, residentes, farmacêuticos, enfermeiros, fisioterapeutas e técnicos do ambulatório de Dermatologia.

Ao grupo de pesquisa do SIM – Serviço de Imunologia do HUPES.

Pelo suporte que viabilizou a minha participação neste curso.

Aos colegas e professores do mestrado

Por tudo o que com eles aprendi e por partilharem a construção do meu estudo.

Aos pacientes, objetivo maior de toda atividade científica, por colaborarem de forma tão generosa com a nossa pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde Universidade Federal da Bahia, a todos os professores, aos colegas de trabalho e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, meus sinceros agradecimentos.

FONTES DE FINANCIAMENTO

*INCT – DT (Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Doenças Tropicais)
PROCESSO Nº 573839/2008-5.

* Bolsa de Estudo da FAPESB.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE GRÁFICOS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
I. RESUMO	16
II. ABSTRACT	17
III. OBJETIVOS.....	18
III.1. OBJETIVO GERAL.....	18
III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
IV. HIPÓTESES.....	19
V. INTRODUÇÃO	20
VI. REVISÃO DE LITERATURA	22
VI.1. EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE.....	22
VI.2. HANSENÍASE: DEFINIÇÃO E FORMAS CLÍNICAS.....	25
VI.3. RESPOSTA IMUNOLÓGICA E ASPECTOS SOBRE MECANISMOS DE ELIMINAÇÃO BACILAR NA HANSENÍASE	32
VI.3.1. IMUNIDADE INATA	32
VI.3.2. IMUNIDADE ADAPTATIVA	33
VI.3.3. APOPTOSE E AUTOFAGIA	34

VI.4. CONCEITO DE MIRNAS E SEU PAPEL NA HANSENÍASE.....	36
VI.5 GENES LIGADOS A PROCESSOS DE ELIMINAÇÃO DE PATÓGENOS ANALISADOS NESTE ESTUDO	39
VII. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
VII.1. LOCAL DO ESTUDO.....	43
VII.2. TIPO DE ESTUDO E DEFINIÇÃO DOS CASOS E CONTROLES.....	43
VII.3. APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	44
VII.4. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	45
VII.5. SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) E EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVA (qPCR)	45
VII.6. JUSTIFICATIVA DA ESCOLHA DOS GENES E ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
VIII. RESULTADOS	48
VIII.1. RESULTADOS DO OBJETIVO 1: Avaliar a expressão de genes ligados a vias de morte celular em um conjunto de biópsias de pacientes com hanseníase e comparar esse padrão de expressão em pacientes com e sem reações.	48
VIII.2. RESULTADOS DO OBJETIVO 2: Avaliar a correlação entre os genes avaliados e os miRNAs previamente testados na amostra.	50
VIII.3. RESULTADOS DO OBJETIVO 3: Descrever o perfil clínico e epidemiológico de pacientes com hanseníase, atendidos em dois centros de referência do estado da Bahia.	
53	
IX. DISCUSSÃO.....	57
X. CONCLUSÃO	63
XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

XII. ANEXOS.....	91
XII.1. ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	91
XII.2. ANEXO 2 - Modelo da Ficha clínica e questionário – PACIENTES	98
XII.3. ANEXO 3 – Research Article.....	101

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características clínico-epidemiológicas dos pacientes matriculados no HUPES-UFBA e Couto Maia.....49

Tabela 2. Características clínico-epidemiológicas do banco de dados dos pacientes matriculados no HUPES-UFBA e Couto Maia.....54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica de casos novos de hanseníase, 2021.....	22
Figura 2. Espectro da Hanseníase, na Classificação de Ridley-Jopling.....	27
Figura 3. Reação Reversa (RR).....	29
Figura 4. Eritema Nodoso Hansênico (ENH).....	31
Figura 5. Biogênese do miRNA.....	37
Figura 6. Expressão dos genes ligados a processos de morte celular avaliados no estudo.....	50
Figura 7. Correlação entre os miRNAs e os genes.....	51

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase por 100 mil habitantes segundo região de residência. Brasil, 2012 a 2021.....	24
Gráfico 2. Proporção de casos novos de hanseníase com grau de incapacidade e com grau 2 avaliados no diagnóstico, Bahia 2012 a 2021.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMN	Ambulatório Magalhães Neto
ATG	Autofagia
BB	Borderline Borderline
BCL2	Linfoma de Células B
BL	Borderline Lepromatoso
BT	Borderline Tuberculóide
CASP	Caspase
c-CLIP	Inibidor da enzima conversora de IL-1 β semelhante a FADD
Ct	Ciclo Limiar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
E	Enzima
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
FADD	Proteína de domínio de morte associada a FAS
GC	Grau Completo
GI	Grau Incompleto
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgard Santos
IB	Índice Bacilar
ICOM	Instituto Couto Maia
IFN	Interferon
IL-1β	Interleucina -1 β
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina 12
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4

IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IQ	Intervalo Interquartil
LC3-PE	Fosfatidiletanolamina Lipídica de Cadeia Leve 3
LL	Lepromatoso Lepromatoso
M1	Macrófagos Pró-Inflamatórios
M2	Macrófagos Anti-Inflamatórios
MB	Multibacilar
MCL-1	Linfoma de células mieloides-1
MS	Ministério da Saúde
NK	Célula Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARK2	Parkina
PARP	Polimerase
PB	Paucibacilar
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PQT	Poliquimioterapia
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNA	Ácido Ribonucleico
RR	Reação Reversa
SE	Sem Escolaridade
SESAB	Secretaria da Saúde do Estado da Bahia
SIM	Serviço de Imunologia
SM	Salário Mínimo
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism
SNARE de ligação	Proteínas solúvel sensível à N-etilmaleimida receptores de fator proteína
STX7	Sintaxina 7

T1	Linfócitos T Auxiliares 1
T2	Linfócitos T Auxiliares 2
TCD4+	Linfócito T Auxiliadores CD4+
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR	Toll-like Receptors
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF - TNF-related apoptosisinducing ligand)
TT	Tuberculoide Tuberculoide
UF	Unidades Federais
UTR	Região Não Traduzida
WHO	World Health Organization

I. RESUMO

Introdução: A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*. Cerca de 30-40% dos pacientes desenvolvem episódios inflamatórios súbitos e agudos, as chamadas reações hansênicas. Estudos anteriores mostraram uma série de miRNAs associados aos fenótipos da hanseníase, evidenciando o papel desse mecanismo epigenético na patogênese da doença. **Objetivo:** Esse trabalho teve como objetivos avaliar a correlação de miRNAs previamente associados à hanseníase com genes ligados à apoptose e autofagia em lesões de pacientes com hanseníase, comparar o padrão de expressão dos genes em biópsias de pacientes com e sem reações e descrever o perfil clínico e epidemiológico de pacientes com hanseníase, atendidos em centros de referência do estado da Bahia, HUPES-AMN e ICOM. **Métodos:** Biópsias de 28 pacientes com e sem reações hansênicas, com as diversas formas clínicas da hanseníase foram recrutados. Para fins de análise, estes pacientes foram alocados de acordo com a classificação da OMS como paucibacilares (PB) ou multibacilares (MB), e separados em pacientes com ou sem reações. Foram utilizadas amostras de RNA contidas em nosso biorepositório, extraídas pelo método do utilizando *TRIzol*[®] Reagente (Ambion[®]). A obtenção de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit comercialmente disponível High Capacity (ThermoFisher). Os genes foram escolhidos por serem importantes em processos de morte celular e serem regulados pelos miRNAs previamente analisados pelo grupo. Expressão gênica pelo método de qPCR em tempo real por TaqMan[®] foi realizada e os dados analisados comparando-se o ciclo limiar (Ct) entre grupos de amostras. A análise de correlação entre genes e miRNAs foi realizada por meio do teste de Correlação de Spearman, utilizando GraphPad Prism8. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p ficou abaixo de 0,05 ($p < 0,05$). O banco de dados clínico-epidemiológico dos pacientes foi analisado através do programa R para Windows, versão 4.2.3 e os dados apresentados por tabelas. **Resultados:** Foi avaliado por qPCR a expressão dos genes *ATG12*, *TNFRSF10A*, *PARK2*, *BCL2*, *CFLAR* e *STX7* e comparada a expressão entre pacientes sem reação (PB + MB) e pacientes com reação, (RR e ENH) e não houve associação estatisticamente significante nesta comparação. Nossos resultados mostraram uma correlação entre os miRNAs e os genes *ATG12* (miR-125a-3p), *TNFRSF10A* (miR-146b-5p), *PARK2*, *CFLAR* e *STX7* (miR-132-5p). Na análise epidemiológica, observamos que a forma MB é mais predominante no sexo masculino e que formas doença dentro deste espectro são mais propensas ao desenvolvimento de reações, assim como atinge pacientes com menor nível educacional e econômico. **Conclusão:** Reforçamos um papel para esses miRNAs na patogênese da hanseníase, influenciando mecanismos como apoptose e autofagia na pele; A forma MB da doença ocorre dentro de um contexto social de maior vulnerabilidade social se comparado aos pacientes PB.

Palavras-chave: miRNAs, Gene, hanseníase, *ATG12*, *TNFRSF10A*, *PARK2*, *BCL2*, *CFLAR*, *STX7*.

II. ABSTRACT

Introduction: Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. About 30-40% of patients develop sudden and acute inflammatory episodes, the so-called leprosy reactions. Previous studies have shown a series of miRNAs associated with leprosy phenotypes, evidencing the role of this epigenetic mechanism in the pathogenesis of the disease. **Objective:** This study aimed to evaluate the correlation of miRNAs previously associated with leprosy with genes linked to apoptosis and autophagy in lesions of patients with leprosy, compare the expression pattern of genes in biopsies of patients with and without reactions and describe the clinical profile and epidemiological analysis of patients with leprosy treated at reference centers in the state of Bahia, HUPES-AMN and ICOM. **Methods:** Biopsies of 28 patients with and without leprosy reactions, with different clinical forms of leprosy were recruited. For analysis purposes, these patients were allocated according to the WHO classification as paucibacillary (PB) or multibacillary (MB), and separated into patients with or without reactions. RNA samples contained in our biorepository were used, extracted by the method using TRIzol® Reagent (Ambion®). Obtaining complementary DNA (cDNA) was performed using the commercially available High Capacity kit (ThermoFisher). The genes were chosen because they are important in cell death processes and are regulated by the miRNAs previously analyzed by the group. Gene expression by real-time qPCR method by TaqMan® was performed and the data analyzed by comparing the threshold cycle (Ct) between groups of samples. Correlation analysis between genes and miRNAs was performed using the Spearman Correlation test, using GraphPad Prism8. Differences were considered significant when the p-value was below 0.05 ($p < 0.05$). The patients' clinical-epidemiological database was analyzed using the R program for Windows, version 4.2.3 and the data presented in tables. **Results:** The expression of the genes *ATG12*, *TNFRSF10A*, *PARK2*, *BCL2*, *CFLAR* and *STX7* was evaluated by qPCR and the expression between patients without reaction (PB + MB) and patients with reaction (RR and ENH) was compared and there was no statistically significant association in this comparison. Our results showed a correlation between miRNAs and *ATG12* (miR-125a-3p), *TNFRSF10A* (miR-146b-5p), *PARK2*, *CFLAR* and *STX7* (miR-132-5p) genes. In the epidemiological analysis, we observed that the MB form is more prevalent in males and that disease forms within this spectrum are more prone to the development of reactions, as well as affecting patients with lower educational and economic levels. **Conclusion:** We reinforce a role for these miRNAs in the pathogenesis of leprosy, influencing mechanisms such as apoptosis and autophagy in the skin; The MB form of the disease occurs within a social context of greater social vulnerability compared to PB patients.

Keywords: miRNAs, Gene, leprosy, *ATG12*, *TNFRSF10A*, *PARK2*, *BCL2*, *CFLAR*, *STX7*.

III. OBJETIVOS

III.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a correlação de miRNAs previamente associados à hanseníase com genes ligados à apoptose e autofagia em lesões de pacientes com hanseníase.

III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

III.2.1. Avaliar a expressão de genes ligados a vias de morte celular em um conjunto de biópsias de pacientes com hanseníase e comparar esse padrão de expressão em pacientes com e sem reações.

III.2.2. Avaliar a correlação entre os genes avaliados e miRNAs previamente testados na amostra.

III.2.3. Descrever o perfil clínico e epidemiológico de pacientes com hanseníase, atendidos em dois centros de referência do estado da Bahia.

IV. HIPÓTESES

IV.1. miRNAS previamente associados com formas clínicas da hanseníase e com índice bacilar, também se correlacionam, no tecido, com genes importantes para processos de eliminação dos patógenos.

IV.2. A população atendida em centros de referência da Bahia, na cidade de Salvador, possui características clínicas e demográficas similar a outras populações afetadas pela hanseníase.

V. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*. A doença, de evolução lenta e insidiosa, apresenta um caráter espectral. Assim, no pólo tuberculóide (TT), poucas lesões cutâneas se associam a uma baixa carga bacilar e à presença da resposta imune celular contra o bacilo de Hansen. No outro pólo da doença, a forma lepromatosa (LL), o quadro clínico de lesões disseminadas está associado a uma alta carga bacilífera e ausência de resposta imune celular. Entre essas duas formas, encontramos pacientes com formas clínicas que são ditas “borderline” (BT, BB e BL) que são de difícil caracterização imunológica. Adicionalmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) criou uma classificação operacional baseada na contagem do número de lesões de pele para facilitar o tratamento da doença (WHO, 1995). Os pacientes são classificados em paucibacilares (PB) com as formas clínicas mais brandas TT e BT ou, multibacilares (MB) com as formas clínicas BB, BL e LL, mais resistentes (WHO, 1982). Além disso, cerca de 30-40% dos pacientes desenvolvem episódios inflamatórios súbitos e agudos, as chamadas reações hanseníacas. As de tipo 1 ou reação reversa (RR) se apresentam clinicamente com neurite ou eritema ou edema das lesões cutâneas; as do tipo 2 ou eritema nodoso hanseníaco (ENH), envolve o aparecimento de nódulos subcutâneos e sintomas como febre, artrite, neurite, entre outros.

Os MicroRNAs (miRNAs) são pequenos ácido ribonucleicos (RNAs) não codificantes, expressos por células eucarióticas que têm papel central na formação, diferenciação e desenvolvimento das células. Os processos ambientais que desregulam a expressão de miRNAs estão associados a várias doenças, incluindo câncer, doenças inflamatórias e infecciosas pois estes interferem diretamente na regulação da expressão gênica e, por conseguinte, na resposta imunológica (BARTEL, 2004; O’CONNELL *et*

al., 2012). Estudos anteriores mostraram uma série de miRNAs associados aos fenótipos da hanseníase, evidenciando o papel desse mecanismo epigenético na patogênese da doença (JORGE *et al.*, 2017, SALGADO *et al.*, 2018, LIU *et al.*, 2012). Anteriormente, o grupo de pesquisa em hanseníase do Serviço de Imunologia do Com-HUPES identificou que o miR-125a-3p foi mais expresso em indivíduos PB quando comparados à indivíduos MB e com RR, sugerindo que o mesmo pode contribuir para uma melhor resposta celular e apoptótica nesta forma clínica. Igualmente, o miR-125a-3p foi também mais expresso em indivíduos com ENH quando comparado à indivíduos MB e correlacionado com um maior índice bacilar (IB) nestes pacientes reacionais, corroborando que o mesmo possa estar envolvido na proliferação e disseminação bacilar no ENH. Similarmente, os miRNAs 146b-5p e -132-5p também foram associados a um maior IB nestes pacientes com reação.

Diante desses achados, é proposta do presente trabalho avaliar a expressão de genes relacionados à resposta imune e a processos de morte celular, especialmente autofagia e apoptose, em biópsias de pacientes com hanseníase, correlacionando-os com miRNAs previamente associados à doença. Em complemento a este trabalho, objetivamos também fazer uma caracterização dos aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes com hanseníase, atendidos no Ambulatório Magalhães Neto do com-HUPES (AMN) e o Instituto Couto Maia (ICOM), entre os anos de 2011 e 2021.

VI. REVISÃO DE LITERATURA

VI.1. EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE

Embora seja curável, a hanseníase continua sendo uma doença endêmica em muitas partes do mundo, principalmente na Índia, Brasil e Indonésia, com mais de 200.000 novos casos notificados anualmente em todo o mundo (BRASIL, 2022; WHO, 2020). Todos os anos, a OMS coleta dados da hanseníase de nações para analisar o cenário atual e emitir um relatório anual global sobre hanseníase. Foram relatados mais de 140.000 novos casos no ano de 2021, uma redução cerca de 40% se comparado ao ano de 2019, justificado pela pandemia do COVID-19 (WHO, 2022). Em comparação às 127 no ano de 2020, 143 nações forneceram estatísticas em 2021, distribuídos conforme mostrado (**Figura 1**).

Figura 1 - Distribuição geográfica de casos novos de hanseníase, 2021.

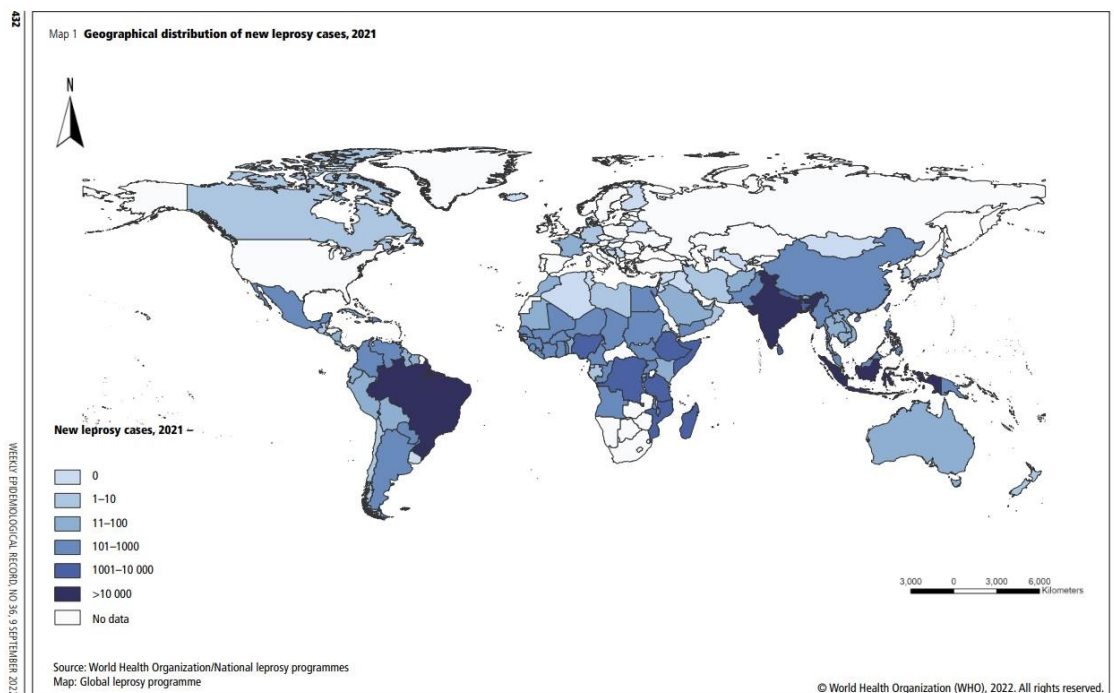
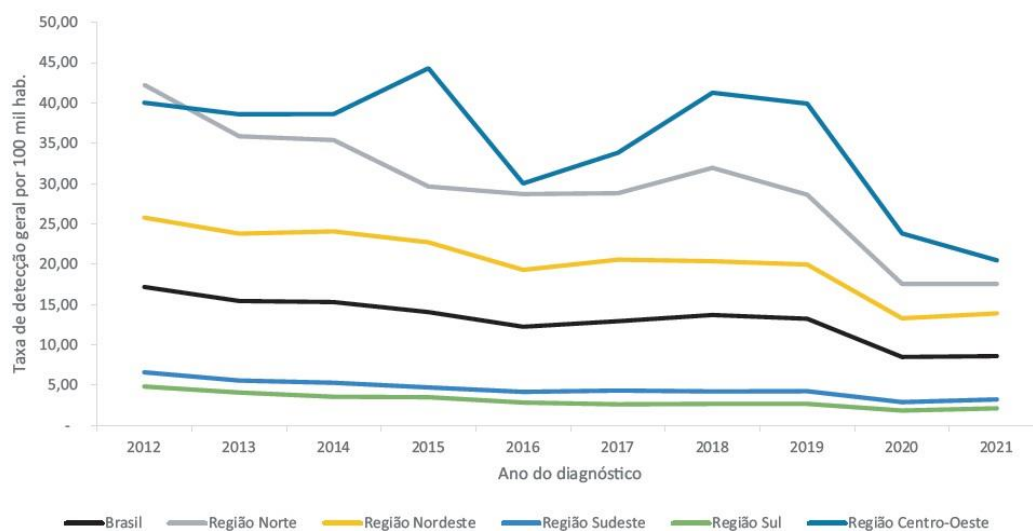


Figura 1 - Das 143 nações que enviaram relatórios, 36 não relataram novos casos, 58 relataram < 100 casos, 36 relataram casos entre 101 - 1.000 e 10 países relataram casos entre 1.001 - 10.000. Fonte: (WHO, 2022).

No Brasil, a hanseníase é uma doença de notificação compulsória, sendo obrigatório que novos casos sejam reportados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan). Cerca de 119.698 novos casos de hanseníase foram diagnosticados no Brasil nos últimos cinco anos (2017 a 2021) (BRASIL, 2023). Nesse total, 66.613 novos casos ou 55,7% dos casos, ocorreram em indivíduos do sexo masculino. A predominância dessa proporção foi observada na maioria das categorias de idade e anos de avaliação, com maior frequência entre os 50 e 60 anos, totalizando 23.192 casos novos (BRASIL, 2023).

O (**Gráfico 1**) mostra a cinética de distribuição dos casos de hanseníase entre os anos de 2012 a 2021. Nota-se uma redução de 17,17 por 100 milhões de habitantes em 2012 para 8,59 por 100 milhões de habitantes em 2021, com uma queda na taxa de detecção geral de casos novos de quase 50,0% (BRASIL, 2023). Entretanto, o menor número de diagnósticos entre 2020 e 2021 pode ter se dado pelas restrições impostas durante a pandemia de COVID-19 (BRASIL, 2022; BRASIL, 2023).

Gráfico 1 - Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase por 100 mil habitantes segundo região de residência. Brasil, 2012 a 2021.



Fonte: Sinan/SVS/MS e IBGE.

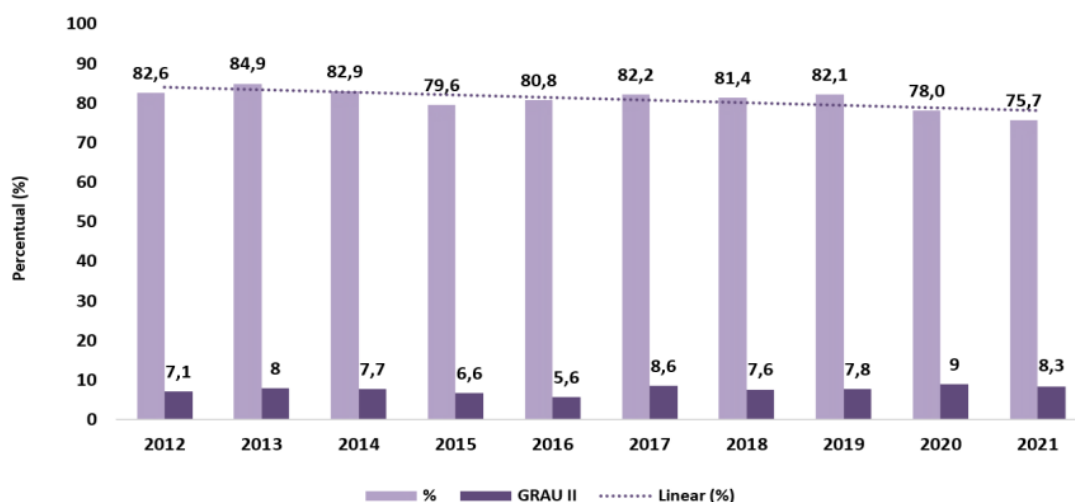
Gráfico 1 - A paridade de endemicidade do país mudou de "alto" para "médio". Em 2021, as 16 Unidades Federais (UF) também passaram por essa mudança de parâmetro. De 2012 a 2021, todas as regiões observaram uma redução na taxa geral de detecção de novos casos de hanseníase. Fonte: (BRASIL, 2023)

Em 2021, na Bahia foram notificados 1.511 casos novos de hanseníase, abrangendo uma taxa de detecção anual de 10,08 casos por 100.000 habitantes, considerada de alta endemicidade segundo padrões internacionais. Destaca-se que o contexto da pandemia de COVID-19 impactou nesse número de detecção de casos (SESAB, 2023). A hanseníase é endêmica e transmissível por contato prolongado quando é observada em pessoas com menos de 15 anos. O estado da Bahia registrou 45 novos casos em menores de 15 anos, o que equivale a uma taxa de detecção de 1,41% por 100.000 habitantes, considerada a endemicidade média para essa faixa etária (SESAB, 2023).

O (Gráfico 2) traz uma das ações utilizadas para o controle da hanseníase que é a prevenção de incapacidades. É possível avaliar a qualidade do atendimento recebido nos

serviços saúde baianos levando em consideração a proporção de incapacidade física no diagnóstico (SESAB, 2023).

Gráfico 2 - Proporção de casos novos de hanseníase com grau de incapacidade e com grau 2 avaliados no diagnóstico, Bahia 2012 a 2021.



Fonte: Sinannet. GT - Hanseníase/DIVEP/SESAB. Base de dados 2021.

Gráfico 2 - A Bahia tem se mantido nos últimos dez anos na faixa de assiduidade (75 a 89,9%). Seguindo essa análise, a proporção de casos novos no estado é considerada média (5,0 a 9,9%) segundo os parâmetros do MS. O grau 2 de incapacidade em casos novos revela um diagnóstico tardio da doença (SESAB, 2023).

VI.2. HANSENÍASE: DEFINIÇÃO E FORMAS CLÍNICAS

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, com alto poder de infectividade, apesar de apenas cerca de 10% dos indivíduos infectados pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) desenvolverem clinicamente a doença. Isso ocorre devido à resistência do hospedeiro, que é conferida por uma resposta imune efetiva e de influência genética (MAYMONE *et al.*, 2020). A transmissão ocorre por meio do contato interpessoal direto e é facilitada pela interação prologada de indivíduos, que não estão sendo tratados, com pessoas suscetíveis ao bacilo. (BRASIL, 2022). Em 2008 foi descoberto o *Mycobacterium*

lepromatosis (*M. lepromatosis*), que possui uma composição genética semelhante e da mesma espécie que o *M. leprae*, com uma quantidade significativa de pseudogenes. Supõe-se que o *M. lepromatosis* e o *M. leprae* advieram de um ancestral em comum há milhões de anos atrás. Apesar do *M. lepromatosis* também ser reconhecido como um agente etiológico causador da hanseníase, o Ministério da Saúde (MS) relata que há uma carência de estudos sobre epidemiologia dessa micobactéria no Brasil e de sua clínica, sendo necessário maiores investigações (HAN *et al.*, 2008; BHANDARI *et al.*, 2022; BRASIL, 2022). A hanseníase frequentemente se manifesta primeiro com a dormência em regiões cutâneas eritematosas ou hipopigmentadas. Se não for tratada, pode levar a danos irreversíveis nos nervos, pele, rosto, mãos e pés. Afeta principalmente a pele e os nervos periféricos. Os sintomas podem variar de leves, como perder as sobrancelhas externas, a mais graves, como deformidade do nariz em sela e neuropatia irreversível (RANDHAWA *et al.*, 2022; WHO, 2021); que podem levar a limitações físicas e perda funcional, principalmente nas mãos, pés e olhos e que podem ser bastante graves nos casos de diagnóstico tardio. (BRASIL, 2022).

Desde a década de 1930, uma série de categorias distintas de hanseníase foram apresentadas, levado em conta dois extremos, “máculo-anestésico” e “nodular”, bem como as apresentações intermediárias. Acreditava-se que as variedades de terminologias e classificações, traziam uma ampla gama de diferentes interpretações da doença (RODRIGUES JÚNIOR *et al.*, 2016; VON MOSTEHT, 1956). A comissão de classificação concordou que era necessário unificar os diferentes pontos de vista quanto as formas da doença e por unanimidade no Congresso de Madrid em 1953, fosse adotado um sistema que é em grande parte clínico, apoiado em dados imunológico e bacteriológicos, definindo as formas TT, LL e a Indeterminada (I) (RODRIGUES DE SOUSA *et al.*, 2022; VON MOSTEHT, 1956). Atualmente há dois tipos de classificação,

o espectro de Ridley-Joplin e a classificação da OMS, para categorizar os pacientes (RANDHAWA *et al.*, 2022). A classificação feita por RIDLEY, JOPLING (1966), trouxe uma maior flexibilidade e otimização a classificação do espectro da hanseníase. Utilizando como base as características clínicas e imunológicas, biópsia de pele e a baciloscopia é descrito os polos como, TT e LL e os subgrupos indeterminados, *borderlines*: *borderline* tuberculóide (BT), *borderline borderline* (BB), *borderline* lepromatoso (BL). A forma indeterminada (I) da doença não pode ser definida pois as características não estão ainda bem desenvolvidas e os pacientes podem, ou não, evoluir para doença tuberculóide ou lepromatosa pois ainda não tiveram uma resposta imune celular do organismo ao bacilo (**Figura 2**) (RIDLEY, JOPLING, 1966; FROES JUNIOR *et al.*, 2022; MAYMONE *et al.*, 2020).

Figura 2 - Espectro da Hanseníase, na Classificação de Ridley-Jopling

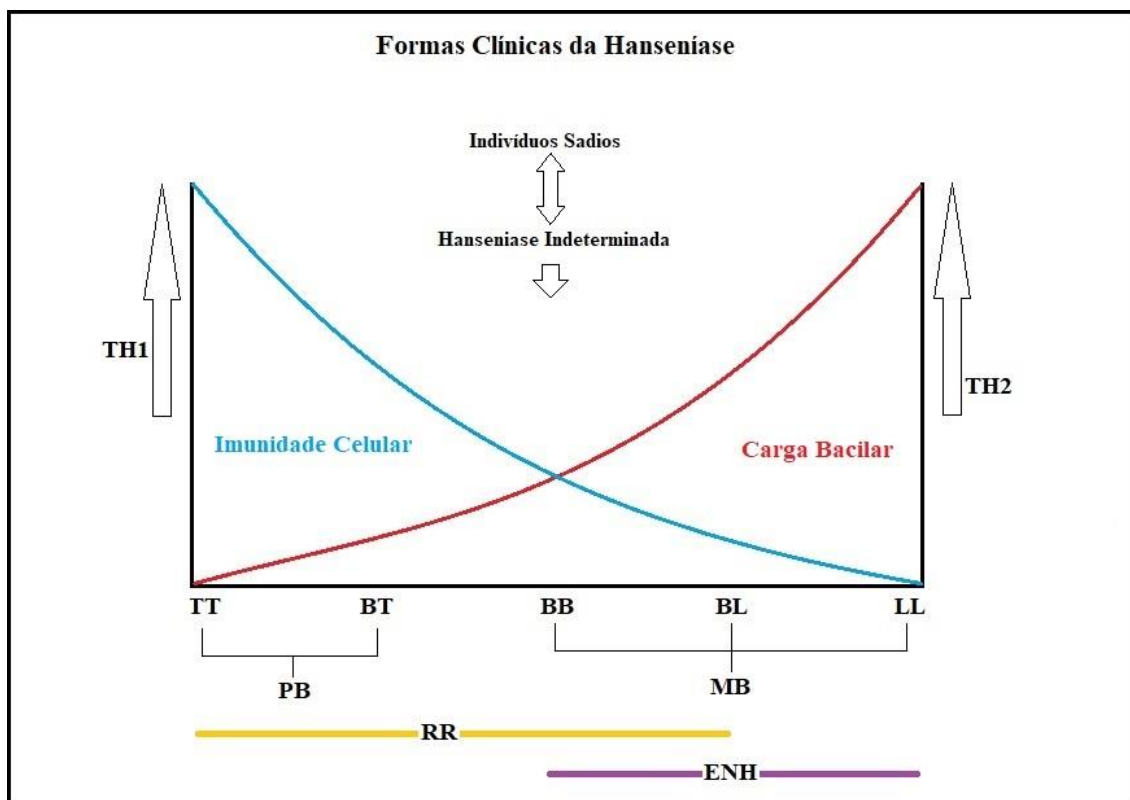


Figura 2. Resposta imune na hanseníase. As formas TT e BT representam o polo PB da doença, caracterizado pela resposta do tipo Th1, enquanto as formas BB, BL e LL compreendem o polo MB do espectro, este caracterizado por um incremento da resposta do tipo Th2. Episódios reacionais do tipo I (RR) estão mais presentes entre as formas TT a BL. Por outro lado, episódios do tipo II (ENH), são predominantes entre as formas BB a LL (FIGUEIRA, 2010; GOULART *et al.*, 2002; ADAPTADO).

Para fins terapêuticos, medicamentosos e de tratamento da hanseníase, por meio da poliquimioterapia (PQT), em 1981 a OMS classificou a doença em PB e MB. Usando a classificação de Madri (1953) a hanseníase indeterminada e tuberculóide são classificadas como PB, as dimorfas ou borderlines e as virchowiana ou lepromatosa como MB. Os indivíduos afetados são categorizados como PB na presença de até cinco lesões de pele ou baciloscopia revelando raspado intradérmico que é negativo, ou MB na presença de seis ou mais lesões cutâneas ou baciloscopia do raspado intradérmico positiva; de acordo com pesquisas sobre bactérias na linfa, a baciloscopia é realizada em vários locais pré-determinados, incluindo lóbulos de lesões, joelhos e cotovelos. (WHO, 2020; BRASIL, 2017; SOUZA *et al.*, 1997).

As reações de hanseníase são sintomas de aumento da atividade da doença com piora clínica que pode ocorrer abruptamente antes, durante ou após a conclusão do tratamento de PQT. E quando elas ocorrem depois do tratamento pode ser devido a uma hanseníase reincidente, ou a fragmentos do bacilo gradualmente decompostos remanescentes no corpo do indivíduo causando uma resposta imunológica, caracterizada por crises de hipersensibilidade aguda definidas pelo agravamento de lesões anteriores ou surgimento de novas lesões (FROES JUNIOR *et al.*, 2022; BRASIL, 2021). As reações são a fonte primária de malformações e deficiências, apesar da terapia prolongada com uma variedade de medicamentos, como corticosteroides, talidomida e medicamentos

imunossupressores. Apesar de serem recomendados pela OMS, esses medicamentos possuem diversos efeitos colaterais que podem levar ao aumento da morbidade (MACHADO *et al.*, 2015; RÊGO *et al.*, 2020). Pessoas com a doença podem desenvolver duas formas comuns de reação à hanseníase. **A reação do tipo 1 ou reação reversa (RR)**, é caracterizada por agravamento súbito de lesões cutâneas já existentes (**Figura 3**), ou surgimento de novas lesões, presença de lesão neurológica periférica proeminente, neurite febril, eritema de lesões preexistentes e resposta inflamatória imediata da pele, mais presentes nas formas TT, BT, BB e BL (BRASIL, 2021).

Figura 3 - Reação Reversa



Figura 3 – Paciente com RR. Foto tirada durante visita ao ambulatório do ICOM e AMN. Acervo pessoal do pesquisador.

As RR são causadas pela resposta celular do tipo Th1 do sistema imunológico em uma reação adaptativa ao *M. leprae*, caminhando com a elevação dos níveis de interferon-gama (*IFN-γ*), fator de necrose tumoral alfa (*TNF*), interleucina-12 (*IL-12*) e a síntese de óxido nítrico induzível (iNOS) (EBENEZER *et al.*, 2021; FARAG *et al.*, 2021; BRASIL, 2021). O diagnóstico de RR é muitas vezes feito clinicamente, embora as biópsias de pele sejam frequentemente úteis para melhor diagnóstico. Apesar de não haver um conjunto de critérios histológicos para RR, os achados típicos incluem células plasmáticas, granulomas epitelioides maciços e edema cutâneo. As lesões cutâneas podem expandir, eritematiza-se mais e até ulcerar (LEGENDRE *et al.*, 2012). O principal fator causador da lesão nervosa, perda funcional nervosa e incapacidades é a RR. Estes pacientes têm um envolvimento nervoso mais pronunciado, que se manifesta na forma de neurite, parestesia e perda motora abrupta que ocasiona no chamado punho em queda, pé caído e paralisia facial. O estado imunológico, idade avançada, terapia com PQT, ou a falta dela, gravidez ou período pós-parto, tipo clínico da hanseníase, baciloscopia positiva, existência de anticorpos glicolípido antifenólico-1 do *M. leprae* (anti PGL-I IgM) e função nervosa deteriorada são algumas das causas potenciais da RR (MAYMORE *et al.*, 2020). **A reação do tipo dois ou eritema nodoso hansênico (ENH)**, ocorre devido a liberação de proteínas dos bacilos decompostos que causam uma resposta imune sistêmica. O ENH afeta vários órgãos do corpo e resulta em sintomas generalizados, caracterizados por nódulos eritematosos dolorosos na face, tronco e membros superiores e inferiores e formação de depósitos de imunocomplexos (**Figura 3**). Outras complicações, incluindo febre, mal-estar, dores no corpo e artralgias, podem acompanhar essa manifestação, assim com hepatite, nefrite, iridociclite e orquite podem estar presentes (RANDHAWA *et al.*, 2022; BRASIL, 2021).

Figura 4 - Eritema Nodoso Hansênico (ENH)



Figura 4 – Paciente com reação de ENH com nódulos palpáveis. Foto tirada durante visita ao ambulatório do ICOM. Acervo pessoal do pesquisador.

O ENH é inerente ao polo virchowiano da doença nas formas BB, BL e LL (PRAGASAM *et al.*, 2020), os episódios duram entre uma e três semanas, e as repetições da reação são frequentes. Indivíduos com lesões cutâneas de ENH possuem quantidades excepcionalmente altas de *TNF* na circulação, além do acúmulo de imunocomplexos extravasculares, produção de citocinas pro inflamatórias e quimiocinas que desencadeiam a resposta inflamatória sistêmica, principal mecanismo imunológico por trás dos sintomas (MAYMORE *et al.*, 2020; EBENEZER *et al.*, 2021; RÊGO *et al.*, 2020)

Algumas nações conseguiram atingir contagens de casos extremamente baixas desde a introdução efetiva do tratamento multimedicamentoso, a PQT (WHO, 2021). A todos os pacientes com hanseníase é seguido um regime de PQT utilizando três medicamentos, que incluem a rifampicina, dapsona e clofazimina, por um período de

tratamento de seis meses para hanseníase PB e doze meses para hanseníase MB. Esta é uma mudança em relação ao tratamento padrão para hanseníase PB, que é rifampicina e dapsona por 6 meses, pois algumas evidências sugerem que há melhores resultados clínicos com um regime de 3 medicamentos, administrados por 6 meses, em vez de 2 medicamentos e 6 meses (WHO, 2019). A rifampicina demonstrou recentemente sua eficácia na redução do risco de transmissão da hanseníase, de pessoas que mantêm contatos de pacientes com a doença, utilizando apenas uma dosagem do medicamento de forma preventiva (WHO, 2021).

VI.3. RESPOSTA IMUNOLÓGICA E ASPECTOS SOBRE MECANISMOS DE ELIMINAÇÃO BACILAR NA HANSENÍASE

VI.3.1. IMUNIDADE INATA

A primeira barreira à infecção com *M. leprae* é a imunidade inata e os receptores de reconhecimento de padrões (*PRRs*) como os toll-like receptors (*TLRs*) representam uma etapa essencial na geração de uma resposta imune contra *M. leprae*, induzindo cascatas de sinalização que ativam genes que codificam citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimuladoras necessárias para a resposta imune adaptativa (MODLIN, 2010; HART, TAPPING, 2012). Além disso, células “natural killer” (*NK*), linfócitos T e macrófagos ativados podem destruir os bacilos, independentemente da ativação da imunidade adaptativa. A resposta imune inata efetiva, modulada pelas células dendríticas, que é a principal célula apresentadora de antígeno, em combinação com a baixa virulência de *M. leprae*, pode ser a base para a resistência ao desenvolvimento de manifestações clínicas da hanseníase. Após a instalação da infecção, a resposta imune do hospedeiro

ainda é indefinida na fase inicial. A regulação de citocinas inflamatórias e quimiocinas podem levar à proliferação de linfócitos T auxiliares 1 (T1) ou T auxiliares 2 (T2), que irão promover a resposta imune celular ou humoral ao *M. leprae*, respectivamente. Isto determinará a evolução da doença na direção TT ou LL dentro do espectro (MEDONÇA *et al.*, 2008; MODLIN, BLOOM, 1993). Outros elementos que desempenham função acessória nesta resposta inata são os neutrófilos, mastócitos e o sistema complemento. No caso deste último, o bacilo é fagocitado pela interação entre o glicolípido fenólico-1 (*PGF-1*), que se liga aos receptores CR1, CR3 e CR4 do complemento nos macrófagos (FROES JUNIOR *et al.*, 2022). Em adição, uma resposta imune inata caracterizada pela ativação da via antimicrobiana dependente de vitamina-D nestas células é descrita como mecanismo de resposta (MONTROYA *et al.*, 2009).

VI.3.2. IMUNIDADE ADAPTATIVA

A apresentação dos antígenos derivados do bacilo aos linfócitos T, que desencadeia a resposta adaptativa, é possibilitada pela capacidade dos macrófagos e das células dendríticas em estimular a fagocitose do *M. leprae*. (ROCHA *et al.*, 2023). Estudos têm demonstrado que a produção de *IFN- γ* pelos linfócitos e *TNF* por monócitos favorece as interações celulares no tecido lesado, bem como a ativação e regulação das moléculas produzidas pelas células epiteliais, mastócitos, monócitos e neutrófilos, tais como as quimiocinas *CXC* (*CXCL8*, *CXCL9* e *CXCL10*) (CHARO, RANSOHOFF, 2006; ALLEN *et al.*, 2007). Na forma TT, as lesões cutâneas exibem uma resposta imune adaptativa caracterizada por citocinas inflamatórias tais como *IL-2*, *TNF*, *IL-1 β* , *IL-12*, *IL-15* (YAMAMURA *et al.*, 1991; SALGAME *et al.*, 1992; BHAT e PRAKASH, 2012; MAZINI *et al.*, 2015), um perfil Interferon Tipo II (*IFN*) (TELES *et al.*, 2013). Por outro

lado, na forma LL, prevalece lesões caracterizadas principalmente por uma resposta imune humoral com produção de anticorpos, incluindo a formação de complexos imunes e presença de citocinas Th2 *IL-4*, *IL-5* e *IL-10* e ativação de células T reguladoras (T reg), um perfil *IFN* Tipo I (TELES *et al.*, 2013).

Em relação às reações hansênicas, na RR o padrão de citocinas Th1 *IL-1 β* , *TNF*, *IL-2* e *IFN- γ* é encontrado nas lesões dos pacientes, além da elevação dos marcadores *TNF*, *IL-17F* e *CXCL-10* no soro (CHAITANYA *et al.*, 2012; KHADGE *et al.*, 2015; RÊGO *et al.*, 2018). O ENH por outro lado, exibe uma evolução rápida com má preservação ou ausência de imunidade celular (HASTINGS *et al.*, 1988). A imunopatogênese é caracterizada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias tais como *IFN- γ* , *IL-1 β* , *TNF*, *IL-6*, *IL-12* em indivíduos que exibem inicialmente uma resposta imune predominantemente humoral (KAHAWITA *et al.*, 2008; LOCKWOOD *et al.*, 2007)

VI.3.3. APOPTOSE E AUTOFAGIA

A apoptose, ou morte celular programada, é essencial para a regulação homeostática de células, restrição de patógenos intracelulares e também para estimulação da resposta imune adaptativa do hospedeiro (HASAN *et al.*, 2006). A autofagia, por outro lado, é um processo necessário para manipulação bacteriana, apresentação de antígenos e geração de resposta de células *TCD4+*, ocorrendo após a ativação de células dendríticas por *NOD2* (SCHENK *et al.*, 2012; COONEY *et al.*, 2010). Um estudo mostrou que a autofagia foi regulada negativamente em pacientes com a forma MB que vieram a desenvolver RR no futuro em um estudo de seguimento (BARBOSA *et al.*, 2018). Em adição, dados mostraram que a expressão de genes de autofagia foram significativamente

aumentados na forma PB, enquanto o fluxo autofágico foi prejudicado na forma MB, sendo restaurado por *IFN- γ* ou rapamicina, sugerindo a autofagia como uma resposta inata dos macrófagos para controlar o *M. leprae* (SILVA *et al.*, 2017). Corroborando com este, outro dado mostra uma maior densidade de células apoptóticas em indivíduos PB em relação a MB, o que indica esta função celular como estratégia para controlar o aumento da carga bacilar (BRITO DE SOUZA *et al.*, 2016). Macrófagos pró-inflamatórios (M1) de pacientes PB estimulados com antígeno de *M. leprae*, que tiveram células apoptóticas removidas da cultura (eferocitose), mostraram aumento da persistência micobacteriana por aumentar a população de macrófagos anti-inflamatórios (M2), num processo acompanhado de redução dos níveis de *IL-15* e *IL-6* e aumento da secreção de *TGF- β* e *IL-10* (FULCO *et al.*, 2014). Finalmente, dados recentes mostraram um alto nível de apoptose e baixa expressão da proteína antiapoptótica, linfoma de células B 2 (*BCL-2*) em lesões tuberculóides, em contraste com a fraca detecção de apoptose e abundante expressão de *BCL-2* em amostras de lepra lepromatosa. Esses dados reforçam que em pacientes lepromatosos uma regulação negativa de apoptose ocorre favorecendo a persistência e multiplicação dos bacilos no interior dos macrófagos, bem como a progressão da doença, enquanto nas lesões tuberculóides níveis mais elevados de apoptose pode contribuir para o controle carga bacilar (SOUSA *et al.*, 2022).

Vários estudos demonstraram que o *TLR2* está associado à autofagia e tem um papel importante na imunopatogênese das infecções micobacterianas (SHIN *et al.*, 2010; FANG *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2003). Atualmente, foi demonstrado os microRNAs miR0125a e miR-23a-5p, inibem ativação da autofagia durante a infecção por *M. tuberculosis* por mecanismos relacionados ao aumento da expressão de *TLR2* (KIM *et al.*, 2015) e, adicionalmente, dados do nosso grupo mostraram associação do miR125a com formas clínicas da hanseníase, que foram interpretados à luz de sua

influência em mecanismos de autofagia dada, função reguladora de genes da família *BLC2* (dados submetidos à publicação).

VI.4. CONCEITO DE MIRNAS E SEU PAPEL NA HANSENÍASE

Os microRNAs (miRNAs) formam uma classe de RNAs reguladores não codificantes, altamente conservados, medindo cerca de 20 a 24 nucleotídeos (nt) de comprimento (UDDIN *et al.*, 2022). Os microRNAs controlam processos biológicos vitais por meio de padrões de expressão específicos, quer seja inerente ao desenvolvimento ou induzidos por estresse (**Figura 4**). Esses pequenos elementos de RNA são potentes reguladores pós-transcricionais que alteram a expressão gênica através do pareamento de bases com a região 3' não traduzida (*UTR*) de seus RNAs mensageiros (mRNAs) alvo, causando clivagem ou degradação dos mesmos (METLAPALLY *et al.*, 2013).

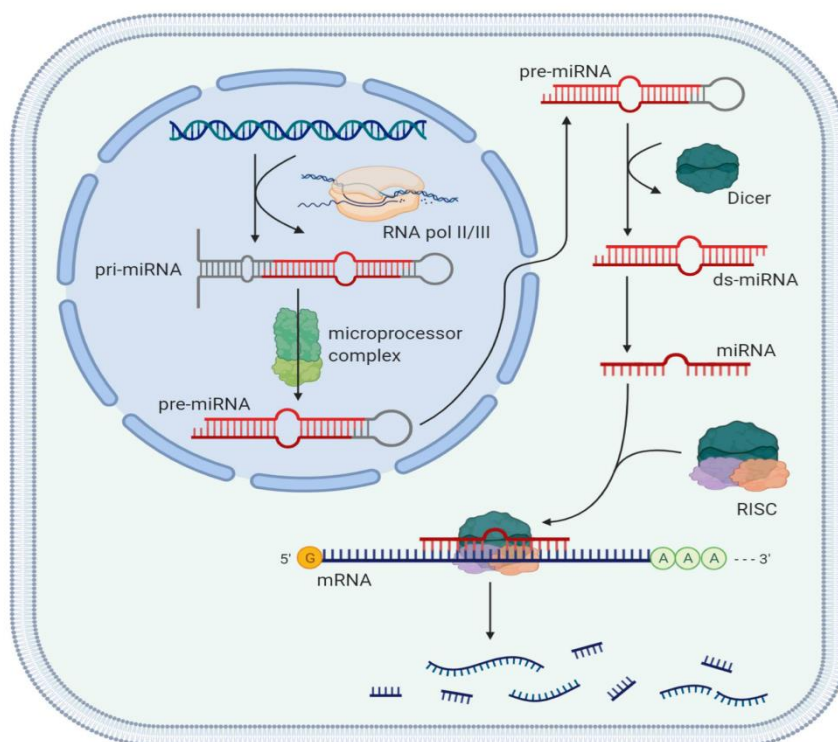
Figura 5 – Biogênese do miRNA

Figura 5 – Processos envolvidos na biogênese do microRNA e como ele controla a expressão gênica (MOHR *et al.*, 2021; PENG, CROCE, 2016; SI *et al.*, 2019, ADAPTADO).

A biogênese de um miRNA diz respeito a todos os eventos, a partir do gene, até se chegar ao miRNA maduro integrado ao complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*), ou seja, transcrição no núcleo celular, maturação e incorporação do miRNA em RISC (HA, KIM, 2014). A maturação, por sua vez, refere-se às etapas que envolvem o processamento do pri-miRNA pela endonuclease chamada DROSHA, RNase tipo III, para produzir um RNA em formato de grampo ou “*hairpin*” com aproximadamente 65 a 67 nucleotídeos (pré-miR), transporte do pré-miR do núcleo para o citoplasma pelo fator de exportação exportina-5 (Exp-5), clivagem do pré-miR no citoplasma pela RNase tipo III específica para dupla-fita (Dicer) em um RNA dupla-fita de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento. Seleção de uma fita do duplex como miR e incorporação no complexo ribonucleico RISC (MURCHISON *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2005). O

complexo miRNA-RISC se liga ao mRNA alvo de maneira sequência-específica, induzindo sua clivagem ou impossibilitando a ligação dos ribossomos (VALENCIA-SANCHEZ *et al.*, 2006). Esse processo é conhecido como silenciamento gênico e acarreta em depleção dos níveis proteicos. Vários miRNAs têm sido associados a doenças complexas tais como câncer, doenças cardiovasculares, infecciosas e neurodegenerativas (TAMGUE *et al.*, 2021). Na hanseníase há ainda uma escassez de trabalhos mostrando o papel dos miRNAs. JORGE *et al.*, 2017, demonstrou que a combinação dos miR-101, miR-196b, miR-27b e o miR-29b é capaz de diferenciar as formas clínicas entre o polo LL e o polo TT, com uma taxa de sensibilidade de 80% e uma especificidade de 91%, o que representa um alto poder diagnóstico (JORGE *et al.*, 2017). Em biópsias de pacientes com hanseníase, o hsa-mir-21 foi diferencialmente expresso na forma progressiva da hanseníase LL, com potencial de regular os genes alvo na via antimicrobiana da vitamina D (LIU *et al.*, 2012). Os resultados obtidos por CEZAR-de-MELLO *et al.*, 2014, estabeleceu uma ligação genética entre o alelo C no SNP (Single-Nucleotide Polymorphism) rs2910164 do miR-146a e a suscetibilidade à hanseníase. Esses achados implicam que, células de linhagem semelhantes a macrófagos (mTHP-1) infectados com *M. leprae* vivo superexpressou o miR-146a, que também foi observado em biópsias de pacientes com hanseníase. O miR-146a, expresso em níveis elevados naqueles com o alelo de risco, corresponde a níveis mais baixos de *TNF* (CEZAR-de-MELLO *et al.*, 2014). Outros achados apontam para uma função essencial da expressão de uma assinatura de miRNAs na imunofisiopatologia da hanseníase, particularmente no controle de apoptose, desmielinização das células de *Schwann*, transição epitelial-mesenquimal e dor neuropática (SALGADO *et al.*, 2018). Anteriormente, o grupo de pesquisa em hanseníase do Serviço de Imunologia do Com-HUPES identificou que o miR-125a-3p foi mais expresso em indivíduos PB quando comparados à indivíduos MB e com RR,

sugerindo que o mesmo pode contribuir para uma melhor resposta celular e apoptótica nesta forma clínica. Igualmente, o miR-125a-3p foi também mais expresso em indivíduos com ENH quando comparado à indivíduos MB e correlacionado com um maior IB nestes pacientes reacionais, corroborando que o mesmo possa estar envolvido na proliferação e disseminação bacilar no ENH, ou seja atuando aqui por uma via distinta e específica desse fenótipo de doença. Por outro lado, o miR-147a foi correlacionado com as quimiocinas *CXCL-8*, *CXCL-10* e IB em indivíduos não reacionais. Sendo todos estes marcadores previamente associados ao desenvolvimento de reações (RÊGO *et al.*, 2018), sugeriu-se que este é um miRNA que pode ser associado a uma susceptibilidade ao desenvolvimento de episódios reacionais.

VI.5 GENES LIGADOS A PROCESSOS DE ELIMINAÇÃO DE PATÓGENOS ANALISADOS NESTE ESTUDO

Uma população isogênica tem heterogeneidade devido a expressão gênica que é um processo dinâmico e estocástico. Ácido desoxirribonucleico (DNA), RNA, proteínas e interações ambientais desempenham um papel na complexa regulação da expressão gênica. A visualização da dinâmica da transcrição e dos seus elementos reguladores na escala de moléculas individuais é agora possível graças aos recentes avanços na tecnologia (BROUWER, LENSTRA, 2019; SIGNOR, NUZHIDIN, 2018).

Os principais genes relacionados à autofagia (*ATG*), é composto por cerca de 20 genes (ou famílias de genes), são necessários para a síntese do autofagossomo. O *ATG12* é uma ubiquitina, uma proteína faz parte de um dos grupos funcionais que são subprodutos do *ATG*. O excesso do processo de autofagia promove o dano celular e apoptose. Esse excesso está fortemente conectado ao *ATG12* (MIZUSHIMA, 2020; LI *et*

al., 2021). *ATG5* era o único alvo identificado do mecanismo de conjugação *ATG12*. A ubiquitina é transferida da enzima *E1* para enzima *E2*, a qual é semelhante a *ATG3*, que combina *ATG8* com o lipídeo fosfatidiletanolamina, demonstrou ser um segundo receptor de conjugação *ATG12*, tem a capacidade de alterar uma variedade de receptores de proteínas em células de mamíferos (RADOSHEVICH, DEBNATH, 2011; GENG, KLIONSKY, 2008). A proteína de interesse é reconhecida por uma ubiquitina ligase *E3*, que por sua vez se migra a ubiquitina de *E2* para um resíduo de lisina no alvo. *ATG12* não necessita do uso de protease durante a conjugação e sua sequência de aminoácidos termina com um resíduo de glicina (GENG, KLIONSKY, 2008).

TNFRSF10A é um receptor ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (*TRAIL*) é referido como receptor de morte 4, *APO2*, *CD261* e *TRAIL-R1*. pode se ligar ao *TRAIL* para iniciar a via apoptótica extrínseca ou do receptor de morte através de um domínio de morte intracelular. Em contraste com a super expressão do *TNFRSF10A*, que teve efeitos opostos, a regulação negativa do *TNFRSF10A* aumentou a taxa de apoptose e a produção das formas clivadas da caspase-3 (*CASP3*) e polimerase (*PARP*) (MORI et al., 2022; WANG et al., 2022). A apoptose acontece quando a *CASP3* é ativada em níveis elevados. Enquanto isso, baixos níveis de ativação de *CASP3* têm sido associados à melhoria da sobrevivência da célula, estimulando vias inflamatórias. Outros receptores de superfície celular associados ao *TNFRSF10A* podem potencialmente ter um impacto nestas vias. Alterações na expressão de *TNFRSF10A* podem estar envolvidas em distúrbios celulares e doenças (KACZYNSKI et al., 2023).

Uma mutação autossômica recessiva relacionada à parkina *PARK2* foi identificada pela primeira vez em 1998. Desde então, um total de 23 mutações distintas foram implicadas no desenvolvimento da doença de Parkinson. O gene *PARK2* funciona como uma ubiquitina ligase. Este processo enzimático destrói os aminoácidos como

consequência da poli-ubiquitilação de proteínas que cumpriram o seu propósito e foram identificadas pelo proteassoma 26S (MIZUNO, 2020). Descobriu-se que o axoplasma das fibras mielinizadas e o citoplasma das células de *Schwann* contêm proteína parkina, e pequenas fibras nervosas autônomas mielinizadas e não mielinizadas ainda estão presentes em portadores mutantes de *PARK2* (DOMINGOS *et al.*, 2015). TIJERO *et al.*, 2015, demonstrou que em nove portadores de *PARK2* e dois irmãos com a mutação *PARK2* documentaram lesões específicas em fibras nervosas de grande diâmetro, bem como redução da amplitude do potencial de ação do nervo sensorial sural.

O *BCL2*, é um membro da família *BCL2* que inibe a apoptose, tem um aumento na expressão em uma variedade de tumores malignos humanos (LIANG *et al.*, 2017). A inclusão de até quatro estruturas de sequência conhecidas como domínios de homólogos *BCL2* distingue as 20 proteínas que compõem a família *BCL2* de outras famílias de proteínas. As proteínas *BCL2* antiapoptóticas e pró-apoptóticas de múltiplos domínios (*BIM*, *BAX* e *BAK*) e as proteínas pró-apoptóticas, somente *BH3*, são as três categorias nas quais as proteínas *BCL2* podem ser subdivididas (VOGLER, 2014). Durante uma infecção micobacteriana, *BCL2* inibe os mecanismos de defesa do hospedeiro. Além de controlar a sobrevivência celular durante a infecção micobacteriana, o *BCL2* também desempenha um papel mais significativo no controle das respostas imunológicas. O envolvimento do *BCL2* vai além do seu papel convencional no controle da sobrevivência celular e se estende ao controle das respostas defensivas das células dendríticas contra micobactérias. São as células apresentadoras de antígenos profissionais mais eficazes para estimular células T virgens e com maior eficácia no desencadeamento de uma resposta imunológica que é antibacteriana e antitumoral. No entanto, para que as micobactérias desenvolvam com sucesso uma infecção duradoura, infectam os macrófagos são os tipos de células alvo (SINGH *et al.*, 2021).

Um promotor negativo crucial da apoptose em células eucariontes é o *CASP8* celular e o regulador de apoptose tipo *FADD* (*CFLAR*) ou inibidor da enzima conversora de *IL-1 β* semelhante a *FADD* (*c-FLIP*). Ele possui dois domínios efetores de morte, que se ligar à proteína adaptadora de domínio de morte associada a *FAS* (*FADD*) de forma antagonista e impedir a ativação das *CASPs* 8 e 10 (LI *et al.*, 2023). Três das 13 variantes de splice produzidas pelo gene *CFLAR* de 14 éxons são expressas como proteínas. Quando as isoformas *c-FLIP* e a heterodimerização da caspase-8, a atividade da caspase-8 é restringida, o que inibe os processos de apoptose. Embora as isoformas curtas do *c-FLIP* sejam apenas inibidores da apoptose, o *c-FLIP* tem a capacidade de induzir a apoptose quando presente em pequenas quantidades e bloqueá-la indiretamente quando localizado em altas concentrações, aumentando a atividade enzimática da caspase-8 (FAIZ *et al.*, 2018). Uma enzima de desubiquitinação de *CFLAR*, a ubiquitina-proteassoma, aumenta a estabilidade e previne a apoptose provocada por receptores extrínsecos (AN *et al.*, 2019).

Membro do grupo Qa da família de proteínas solúvel sensível à N-etilmaleimida receptores de fator proteína de ligação (*SNARE*), Sintaxina 7 (*STX7*) induz as vias de endocitose e exocitose, bem como procedimentos de transporte molecular em processos secretores (WU *et al.*, 2023). *STX7* afeta a fusão de fagossomas e lisossomas, bem como o tráfego de vesículas para essas organelas (CASTELLUCCI *et al.*, 2021). *STX7* é essencial para o desenvolvimento de invadopódios e atividades relacionadas, podem estar envolvidos no tráfego de carga de sinalização, essencial para o desenvolvimento de invasopódios em sua fase inicial (PARVEEN *et al.*, 2022). *STX7* foi identificado em fagossomas maduros em macrófagos, facilita o transporte da citocina inflamatória *TNF* para a membrana plasmática. Um processo regulador crucial na formação de complexos *SNARE* endossomais é a fosforilação de *STX7* (ACHUTHAN *et al.*, 2008).

VII. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

VII.1. LOCAL DO ESTUDO

O presente estudo foi desenvolvido no Serviço de Imunologia (SIM), localizado no Hospital Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Os indivíduos que formaram a população de estudo foram selecionados de duas unidades de referência estadual para tratamento e acompanhamento da hanseníase: Ambulatório de Dermatologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos - Ambulatório Magalhães Neto (AMN-UFBA) e Instituto Couto Maia (ICOM), ambos na cidade de Salvador-BA. O ambulatório do AMN-UFBA anualmente diagnostica cerca de 50 a 60 novos casos da doença. O ICOM, especialista no tratamento de doenças infecciosas e parasitárias, desde 2013, passou a atender os pacientes com hanseníase oriundos do extinto Hospital Dom Rodrigo de Menezes.

VII.2. TIPO DE ESTUDO E DEFINIÇÃO DOS CASOS E CONTROLES

Este foi um estudo do tipo caso-controle e transversal na análise do banco de dados, no qual indivíduos de ambos os sexos, acima de 18 anos e diagnosticados no espectro da hanseníase foram convidados a participar. O diagnóstico clínico e laboratorial, bem como a classificação das formas da hanseníase foram feitas de acordo com os critérios estabelecidos pelo MS (BRASIL, 2016), nas seguintes formas clínicas: TT, BT, BB, BL e LL. Pacientes sem evidência do desenvolvimento de episódio reacional atual ou pregressa foram definidos como controles. Para fins de análise, estes pacientes foram também alocados como PB ou MB, de acordo com sua forma clínica. Foram considerados *casos*, indivíduos diagnosticados com RR e ENH, antes ou durante o

tratamento com a PQT, bem como após seu retorno para acompanhamento. Para os estudos de expressão gênica, foram recrutados pacientes ao diagnóstico, isentos de tratamento e de imunossupressores (no caso da presença de reações). Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) - **ANEXO I**, os participantes foram submetidos a um questionário clínico-epidemiológico para coleta de informações relativas às suas características sociodemográficas e ocupacionais (**ANEXO II**). Gestantes e indivíduos com outras doenças infecciosas ou autoimunes ou que se recusaram a participar não foram incluídos no estudo.

VII.3. APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O material biológico utilizado nesse estudo faz parte do nosso biorrepositório e seu reuso está previsto em projeto: *Avaliação da expressão de miRNAs envolvidos na regulação de genes participantes da resposta imune ao M. Leprae identificados a partir de um estudo de expressão gênica (CAAE 68790417.3.1001.0049)*. Os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes por sua vez, foram coletados durante a execução do projeto *Genes associados a processos de autoimunidade como biomarcadores do desenvolvimento de surto reacional na hanseníase (CAAE 37246914.4.0000.5577)*. Ambos, anteriormente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia. No entanto, este estudo também contou com aprovação do CEP-HUPES (CAAE: 47999921.0.0000.0049).

VII.4. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Foram utilizadas amostras de RNA contidas em nosso biorepositório, extraídas pelo método do utilizando *TRIzol*[®] *Reagente* (Ambion[®]), como descrito a seguir: (a) o tecido foi macerado em uma placa de petri em poliestireno contendo 500µl de TRIzol[®] e transferido para tubos de 1,5ml; (b) foram adicionados mais 500µl de TRIzol e 200µl de clorofórmio e, após homogeneização, feita uma centrifugação a 12 000 (rpm) por 5 minutos; (c) a fase aquosa formada contendo o RNA foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml e adicionados 500µl de isopropanol e 2µl de glicogênio com nova homogeneização e centrifugação a 12.000 (rpm) por 10 minutos para descarte do sobrenadante; (d) foi adicionado 1000µl de etanol a 75% com posterior centrifugação a 7 500 (rpm) por 5 minutos. O RNA foi ressuspense em 25µl de água livre de RNase. A pureza de RNA total foi determinada por medições de densidade óptica (260nm e 280nm) usando L-Quant 2 e as amostras armazenadas a -70°C até o uso.

VII.5. SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) E EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVA (qPCR)

A obtenção de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit comercialmente disponível High Capacity (ThermoFisher), seguindo as orientações do fabricante. Para cada reação foi adicionado em tubo de 1,5 ml o 2X RT master mix da reação com os seguintes componentes: 2µl de 10x *RT Buffer*, 0,8µl de *dNPT Mix* (100 mM), 2µl de 10x *RT Random Primers*, 1µl de *MultiScribe*TM *Reverse Transcriptase* e 4,2µl de *RNase-free water*. Em uma placa de reação foi adicionado 2µl da amostra (5ng/µl) e 8µl do mix de reação por poço, que foram assim ciclados: (I) 10 minutos a 25°C, (II) 120

minutos a 37°C, (III) 5 minutos a 85°C e (IV) Hold 4°C. O cDNA foi estocado a -20°C, até o uso. Para o qPCR, ensaios TaqMan® pré-desenhados contendo primers e sondas específicos para os genes *ATG12*, *TNFRSF10A*, *PARK2*, *BCL2*, *CFLAR* e *STX7* foram adquiridos da ThermoFisher e executados como a seguir, com cada amostra em duplicata: 5µl de *Master Mix (2X)*, 0,5µl de *TaqMan™ Gene Expression Assay (20X)* e 2,5µl de *RNase-free water*; para cada reação foi utilizado 2µl do cDNA template diluído (1:5) e 8µl do mix de reação descrito. As condições de amplificação foram: (I) 2 minutos a 50°C, (II) 20 segundos a 95°C, (III) 1 segundo a 95°C, (IV) 20 segundo a 60°C e (V) por 40 ciclos seguindo da Curva de dissociação (melting curve) implementados através do equipamento QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific).

VII.6. JUSTIFICATIVA DA ESCOLHA DOS GENES E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados relativos à metodologia e análise da expressão dos miRNAs fizeram parte de outro projeto de tese e, portanto, não serão descritas nesta dissertação. Os miRNAs -146a-5p, -146b-5p, -147a, -155-5p, -9-3p, -125a-3p, -132-5p, 21-3p, hsa-let-7a-3p, -511- 3p, -103a-3p foram analisados de acordo com sua participação na via de ativação dos *TLRs*. Para acessar essa informação, consultar manuscrito no ANEXO III. Os genes foram escolhidos por serem importantes em processos de morte celular como apoptose e autofagia, o racional que a nosso ver, teria maior plausibilidade biológica para justificar a participação dos miRNAs testados nas análises iniciais. Para os genes escolhidos, os dados foram analisados comparando-se o ciclo limiar (Ct), conforme a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ onde $\Delta\Delta CT$ é o valor de ΔCT de cada indivíduo menos a mediana de ΔCT do grupo controle (pacientes sem reação). A análise de correlação entre genes e

miRNAs foi realizada por meio do teste de Correlação de Spearman, utilizando GraphPad Prism8. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p ficou abaixo de 0,05 ($p < 0,05$). O banco de dados clínico-epidemiológico dos pacientes foi realizado através do programa R para Windows, versão 4.2.3 e os dados apresentados por tabelas e gráficos.

VIII. RESULTADOS

VIII.1. RESULTADOS DO OBJETIVO 1: Avaliar a expressão de genes ligados a vias de morte celular em um conjunto de biópsias de pacientes com hanseníase e comparar esse padrão de expressão em pacientes com e sem reações.

A **Tabela 1** mostra as características clínicas dos pacientes que tiveram biópsias colhidas para o estudo. Foi avaliado por qPCR a expressão dos genes *ATG12*, *TNFRSF10A*, *PARK2*, *BCL2*, *CFLAR* e *STX7* e comparada a expressão entre pacientes sem reação (PB + MB) e pacientes com reação, RR e ENH. As medianas de expressão foram parecidas entre os grupos e não houve associação estatisticamente significativa nesta comparação, **Figura 6**. Assim também como não houve diferenças na comparação entre os grupos PB+MB vs RR+ENH (juntos), ou mesmo comparando-se apenas PB vs MB, dados não mostrados.

Tabela 1

**Características clínico-epidemiológicas dos pacientes matriculados no
HUPES-UFBA e Couto Maia**

	NÃO REACIONAL	REACIONAL
	(n=14)	(n=14)
Idade (média ± DP*)	47,78 ± 16,65	44 ± 16,35
Sexo, %		
Masculino	M*= 8/14 (57,14%)	M*= 9/14 (64,3%)
Feminino	F*= 6/14 (42,86%)	F*= 5/14 (35,7%)
Fenótipo clínico		
Paucibacilar (PB), %		
Tuberculoide (TT)	3/7 (42,86%)	0/0
<i>Borderline</i> Tuberculoide (BT)	4/7 (57,14%)	1/6 (16,7%) (RR*)
Multibacilar (MB), %		
<i>Borderline Borderline</i> (BB)	1/7 (14,3%)	4/6 (66,6%) (RR*)
<i>Borderline</i> Lepromatosa (BL)	1/7 (14,3%)	1/6 (16,7%) (RR*)
Lepromatosa (LL)	5/7 (71,4%)	1/8 (12,5%) (ENH*) 7/8 (87,5%) (ENH*)
Pacientes com reação hansênica, %		6 (RR*) 8 (ENH*)
Índice baciloscópico (Mediana, IQ*)	0 (0-4,3)	2,5 (0,2-4,7)

M*: Masculino; **F***: Feminino; **RR***: Reação Reversa; **ENH***: Eritema Nodoso Hansênico; **DP**: Desvio Padrão; **IQ***: Intervalo interquartil.

Figura 6 – Expressão dos genes ligados a processos de morte celular avaliados no estudo.

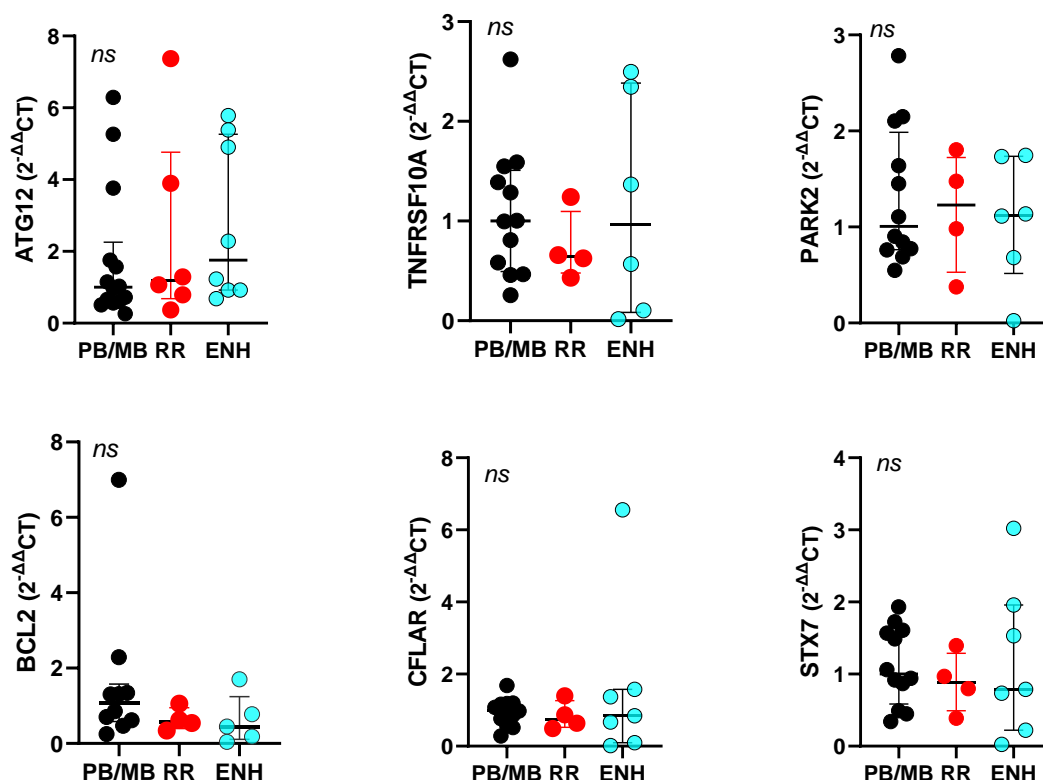


Figura 6 - Boxplots representando os valores de expressão dos genes *ATG12*, *TNFRSF10A*, *PARK2*, *BCL2*, *CFLAR* e *STX7* em biópsias. Os grupos analisados foram os indivíduos sem reação (PB/MB) contra indivíduos com RR e ENH. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, $p \geq 0,05$, *GraphPad Prism 8*.

VIII.2. RESULTADOS DO OBJETIVO 2: Avaliar a correlação entre os genes avaliados e os miRNAs previamente testados na amostra.

Nas mesmas biópsias testadas, e como parte do projeto, temos dados submetidos à publicação (**ANEXO III**) que mostram um aumento significativo na expressão do miR-125a-3p em pacientes PB vs MB ($p = 0,007$) e vs RR ($p = 0,005$), respectivamente; assim como maior expressão em pacientes com ENH vs MB sem reações ($p = 0,002$). Em adição, houve uma correlação positiva entre a expressão dos miR-125a-3p, miR-146b-5p e miR-132-5p e IB em pacientes reacionais.

No grupo de pacientes PB, houve uma correlação negativa entre o mir-125a-3p e o gene *ATG12* ($r = -0.9$, $p = 0.006$). Já nos indivíduos com reações, o miR-146b-5p foi inversamente correlacionado com o gene *TNFRSF10A* ($r = -0,6$, $p = 0,034$). Similarmente, também no grupo de pacientes reacionais o miR-132 está negativamente correlacionado com os genes *PARK2* ($r = -0,8$, $p = 0,015$), *CFLAR* ($r = -1,0$, $p = 0,0004$) e *STX7* ($r = -0,7$, $p = 0,036$) (**Figura 7 A-E**)

Figura 7 - Correlação entre os miRNAs e os genes.

Figura 7. A

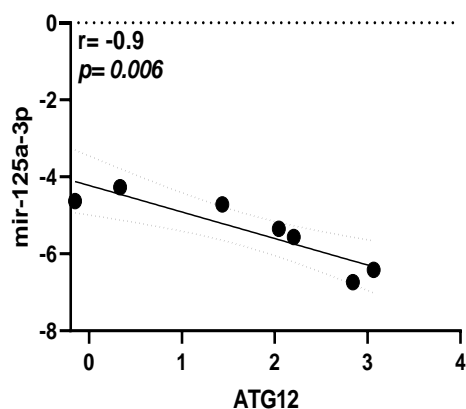


Figura 7. B

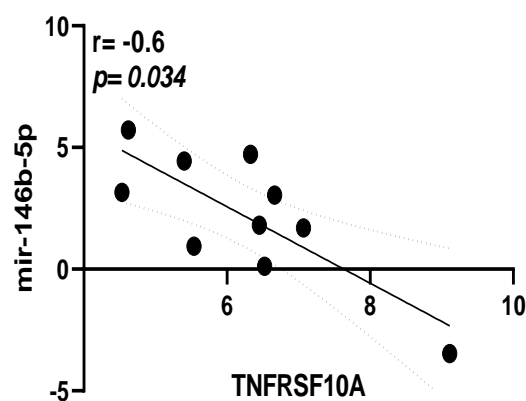


Figura 7. C

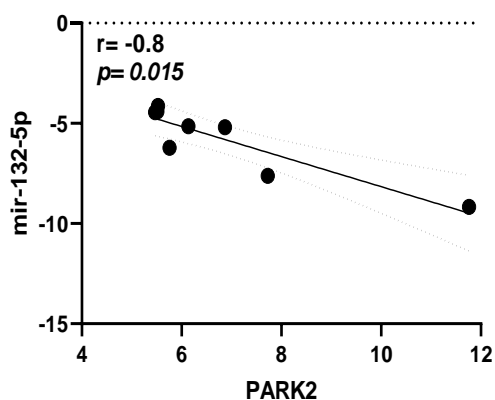


Figura 7. D

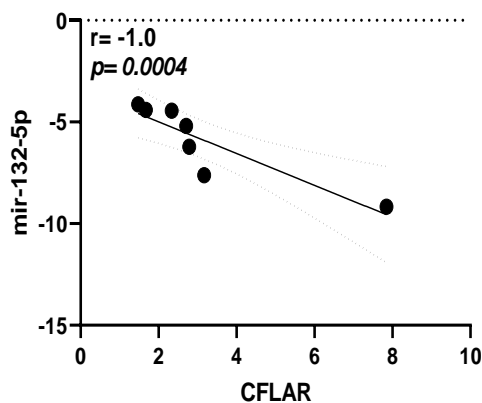


Figura 7. E

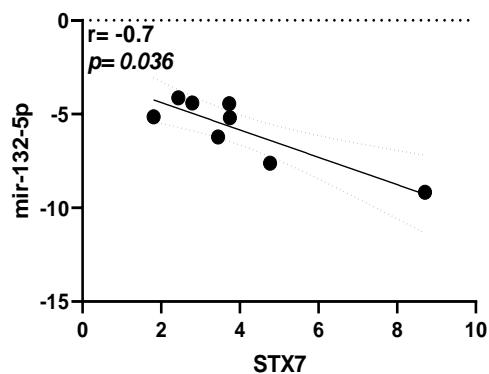


Figura 7.A a E - Análise de correlação entre a expressão relativa de miR-125a-3p e *ATG12* (A), miR-146b-5p e *TNFRSF10A* (B) e miR-132-5p com *PARK2* (C), *CFLAR* (D) e *STX7*(E) em biópsias de indivíduos LR (RR + ENH). Dados analisados pelo teste de Correlação de Spearman, utilizando o software GraphPad Prism, onde foi considerado $r \geq 0,7$. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

VIII.3. RESULTADOS DO OBJETIVO 3: Descrever o perfil clínico e epidemiológico de pacientes com hanseníase, atendidos em dois centros de referência do estado da Bahia.

Ao longo dos anos de 2011 a 2021, foram aplicados questionários para avaliação de fatores sociodemográficos e clínicos de pacientes provenientes do AMN e do ICOM. No total, foram analisados questionários de 565 pacientes oriundos dos dois centros. Para apresentação dos dados, estes pacientes foram alocados como PB e MB e comparações entre os grupos realizadas pelo teste exato de Fisher. Em termos gerais, a média de idade foi de 44 ± 14 anos, sendo 254 (45%) do sexo feminino e 311 (55%) do sexo masculino em toda a amostra. Observamos algumas diferenças sociais e clínicas entre os dois grupos. Notadamente, pacientes PB possuem maior percentual de pessoas com renda superior a um salário mínimo e maior nível de escolaridade. Estes pacientes também tem mais alergias do que os do grupo MB, enquanto para doenças como hipertensão (HAS) e diabetes não houveram diferenças significativas. Como previsto, o grupo MB apresentou em grande maioria índice bacilar mais elevado, assim como o desenvolvimento de reações hansenícas, inclusive ocorreram casos de o paciente apresentar os dois de tipo de reação concomitantemente, o que condiz com seu perfil clínico e imunológico. Finalmente, estes pacientes também apresentaram maior número de casos de hanseníase na família, o que ocorre provavelmente devido sua maior carga bacilífera, que favorece a disseminação da doença. Todos os dados relacionados a estas análises são apresentadas com maiores detalhes na **Tabela 2**.

Tabela 2

**Características clínico-epidemiológicas do banco de dados dos pacientes matriculados no
HUPES-UFBA e Couto Maia**

	MB	PB
Sexo, %; $p = < 0,01$		
Masculino	224/323 (69,3%)	87/242 (36%)
Feminino	99/323 (30,7%)	155/242 (64%)
Doenças associadas a hanseníase		
	MB	PB
Alergia, %; $p = 0,03021$		
Sim	51/312 (16,3%)	57/238 (23,9%)
Não	261/312 (83,7%)	181/238 (76,1%)
Diabetes, %; $p = 0,663$		
Sim	32/316 (10,1%)	21/238 (8,8%)
Não	284/316 (89,9%)	217/238 (91,2%)
Has, %; $p = 0,0701$		
Sim	66/315 (21%)	66/238 (27,7%)
Não	249/315 (79%)	172/238 (72,3%)
Índice Bacilar		
	MB	PB
Baixo, %; $p = 0,0109$		
Negativo	1/19 (5,3%)	9/22 (40,9%)
Baixo (IB < 2)	18/19 (94,7%)	13/22 (59,1%)
Médio, %; $p = 0,0001191$		
Negativo	1/10 (10%)	9/9 (100%)
Médio (IB 2,1 - 4)	9/10 (90%)	0/9 (0%)
Alto, %; $p = 0,0004114$		
Negativo	1/9 (11,1%)	9/9 (100%)
Alto (IB > 4)	8/9 (88,9%)	0/9 (0%)
Reações Hansenícas		
	MB	PB
RR, %; $p = 0,001106$		
Sem Reação	102/170 (60%)	182/241 (75,5%)
Reação Reversa	68/170 (40%)	59/241 (24,5%)

ENH, %;	$p = < 0,01$		
Sem Reação		102/232 (44%)	182/183 (99,5%)
ENH		130/232 (56%)	1/183 (0,5%)
RR e ENH, %;	$p = < 0,01$		
Sem Reação		102/125 (81,6%)	182/182 (100%)
RR e ENH		23/125 (18,4%)	0/182 (0%)

Uso de Corticoides durante as reações hansenícas

	MB	PB
Prednisona, %;		
Sim	103/320 (32,2%)	38/236 (16,1%)
Não	217/320 (67,8%)	198/236 (83,9%)
Talidomida, %;		
Sim	73/319 (22,9%)	1/237 (0,4%)
Não	246/319 (77,1%)	236/237 (99,6%)

Dados Familiares

	MB	PB
Escolaridade, %;		
SE a 2°GI	223/316 (70,6%)	119/237 (50,2%)
2°GC a 3°GC	93/316 (29,4%)	118/237 (49,8%)
Renda Familiar, %;		
≤ 1 SM	133/313 (42,5%)	75/236 (31,8%)
> 1SM	180/313 (57,5%)	161/236 (68,2%)
Hanseníase na Família, %;		
Sim	80/313 (25,6%)	43/238 (18,1%)
Não	233/313 (74,4%)	195/238 (81,9%)
Número de casos na Família, %;		
0 a 1	50/74 (67,6%)	27/40 (67,5%)
2 a 6	24/74 (32,4%)	13/40 (32,5%)
Hanseníase Residência, %;		
Sim	45/314 (14,3%)	34/237 (14,3%)
Não	269/314 (85,7%)	203/237 (85,7%)
Número de casos na Residência, %;		
0 a 1	27/41 (65,9%)	25/32 (78,1%)
2 a 6	14/41 (34,1%)	7/32 (21,9%)

MB: Multibacilar; **PB:** Paucibacilar; **RR:** Reação Reversa; **ENH:** Eritema Nodoso Hansênico; **IB:** Índice Bacilar; **SM:** Salário Mínimo; **HAS:** Hipertensão Arterial Sistêmica; **SE:** Sem Escolaridade; **GI:** Grau Incompleto; **GC:** Grau Completo

IX. DISCUSSÃO

A infecção pelo *M. leprae* evolui de acordo com a resposta imunológica específica do hospedeiro frente ao bacilo. É a combinação entre fatores ambientais, carga bacilar e fatores genéticos que podem levar à hanseníase clínica. O avanço nas técnicas moleculares permitiu a identificação de múltiplos genes como fatores de risco na hanseníase (FAVA *et al.*, 2019). Isso inclui elementos gênicos reguladores da transcrição como os microRNAs (miRNAs) (LIU *et al.*, 2012; JORGE *et al.*, 2017; SALGADO *et al.*, 2018), que desempenham papéis desde a homeostase celular normal até metástase e patogênese de doenças (SUN *et al.*, 2013). Os miRNAs participam amplamente de mecanismos da resposta imune a exemplo da ativação das vias sinalizadas pelos *TLRs*, culminando na produção de citocinas e quimiocinas que vão ativar, recrutar e promover a morte celular programada como estratégias de eliminação de patógenos. (O'NEILL *et al.*, 2011).

Em relação ao objetivo 1 do estudo, a expressão dos genes escolhidos mostrou-se similar entre as diferentes formas de hanseníase, seja comparando entre pacientes com e sem reações, seja comparando dentro de cada um destes grupos (PB x MB ou RR vs ENH). Os genes *ATG12*, *TNFRSF10A*, *PARK2*, *BCL2*, *CFLAR* e *STX7* foram selecionados por serem regulados pelos miRNAs já estudados nessa amostra e pelo seu papel biológico previamente documentado em processos de morte celular e eliminação de patógenos. Embora nossa premissa era de que possivelmente poderia haver alguma diferença de expressão destes genes, por exemplo, entre pacientes com e sem reações, nossos resultados não confirmaram essa hipótese, possivelmente pela sua produção ser constante ou pouco variável desde a infecção até o desenvolvimento de qualquer de suas formas clínicas. Em relação ao objetivo 2, anteriormente o grupo de pesquisa em hanseníase do Serviço de Imunologia do Com-HUPES identificou que o miR-125a-3p foi

mais expresso em indivíduos PB quando comparados à indivíduos MB e com RR, sugerindo que o mesmo pode contribuir para uma melhor resposta celular e apoptótica nesta forma clínica, no sentido de conter o bacilo. Por outro lado, nós observamos uma correlação negativa entre o miR-125a-3p e o gene *ATG12* em pacientes PB. A proteína essencial de autofagia *ATG12* é um mediador positivo da apoptose mitocondrial. Dados mostram que *ATG12* regula diretamente a via apoptótica ligando e inativando membros pró-apoptóticos da família *BCL-2*, incluindo *BCL-2* e infoma de células mieloides-1 (*MCL-1*) (RUBINSTEIN *et al.*, 2011). miRNAs que afetam a expressão de ATGs também influenciam diferentes fases da autofagia, que vão desde a indução até a fusão e degradação lisossômica. Foi relatado que vários miRNAs participam dos sistemas de conjugação *ATG5-ATG12-ATG16L* e fosfatidiletanolamina lipídica de cadeia leve 3 (*LC3-PE*) que regulam o alongamento dos autofagossomos (SHAN *et al.*, 2021). Dados mostraram que a autofagia foi regulada diferencialmente em pacientes T-lep e L-lep. Nesse caso, as células T-lep da lesão da pele mostraram uma regulação positiva de genes associados ao aumento da formação de autofagossomos. Em contraste, em células de lesão de pele L-lep houve uma inibição do fluxo autofágico, restaurado via tratamento com *IFN-γ*. Esses dados nos sugerem que é possível que uma maior expressão de miR-125a-3p nas biópsias de PB e sua concomitante inibição na expressão de *ATG12* que observamos possa ser um fator contribuinte para haver uma resposta apoptótica mais eficiente em T-lep, levando a um fenótipo de doença mais brando, embora contribuiria para um aumento na carga bacilar (SILVA *et al.*, 2017).

O miR-146b-5p desempenha um papel essencial na regulação negativa da produção de citocinas pró-inflamatórias e proliferação celular, modulando assim a intensidade da resposta inflamatória (PERRY *et al.*, 2008). Estudos anteriores sugeriram que o miR-146a vincula a resposta imune inata à transformação oncogênica (WILLIAMS

et al., 2008; BOLDIN *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2011) e, em camundongos, a deficiência de miR-146a foi associada à desregulação crônica da sinalização de *NF-κB*, produzindo um fenótipo com características de malignidade mielóide (ZHAO *et al.*, 2011). *TNFRSF10A* e *TNFRSF10B* são receptores de superfície celular que se ligam ao ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (*TRAIL*) e medeiam a via extrínseca da apoptose (LI *et al.*, 2015). Assim, nosso achado de que o miR-146b-5p inibe o *TNFRSF10A* em pacientes com reações sugere que isso pode estar implicado em um prejuízo na eliminação do *M. leprae*, favorecendo a disseminação do bacilo e seus antígenos nas lesões de hanseníase.

O miR-132 tem sido proposto como um regulador da estrutura e função neuronal, sendo implicado, por exemplo, na dor neuropática após lesão constritiva crônica e lesão nervosa poupada (ARAI *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2015; DONATE *et al.*, 2021). O *M. leprae* afeta os nervos, causando incapacidades que são mais frequentes durante as reações. Aqui, o miR-132 foi correlacionado com genes importantes para a resposta ao *M. leprae* nestes pacientes - *PARK2*: PARKIN ou gene da doença de Parkinson é uma ubiquitina ligase com papel bem estabelecido na mitofagia. A ubiquitinação mediada por PARKIN leva ao direcionamento autofágico de *M. tuberculosis* e é essencial para a inibição da replicação micobacteriana em macrófagos (MANZANILLO., 2013). Dados anteriores do nosso grupo mostram que existe uma assinatura para RR no sangue, compreendendo genes principalmente relacionados com as respostas imunes inatas, incluindo componentes do *IFN* tipo I, autofagia, parkins e TLRs. Além disso, *PARK2* foi expresso diferencialmente no grupo ENL, corroborando com dados de que fragmentos de bactérias mortas podem continuar o processo inflamatório característico de ambos os episódios reacionais levando a danos nos nervos e tecidos (RÊGO *et al.*, 2020); *CFLAR*: Esta é uma proteína semelhante à CASP, mas carece de atividade catalítica. Regula

apoptose, necroptose, autofagia e inflamação (LIAO, 2022). Dependendo do contexto inflamatório, esses mecanismos perdem a homeostase, aumentando a morte celular e consequentemente o dano tecidual e nervoso, elevando a liberação de *PAMPs* (patogen-associated molecular patterns) e *DAMPs* (danos associados a padrões moleculares), em pacientes que desenvolvem reações; *STX7*: *STX7* influencia o tráfego de vesículas para os lisossomos, incluindo a fusão fagossomo-lisossomo (WANG *et al.*, 1997). É possível que uma regulação negativa do *STX7* possa influenciar a entrega dos fagossomas do *M.leprae* aos lisossomos dos macrófagos. Além disso, o *STX7* também é expresso em linfócitos T citotóxicos e os dados mostraram que a regulação negativa desse gene leva à destruição mediada por linfócitos T citotóxicos, afetando a atividade citolítica dos linfócitos T humanos (PATTU *et al.*, 2011). Em conjunto, poderíamos pensar que uma regulação negativa desse gene poderia prejudicar a retração do bacilo, favorecer a disseminação e aumentar ainda mais o processo inflamatório.

Os dados fornecidos neste artigo reforçam o papel dos miRNAs na modulação de parâmetros imunológicos e clínicos da hanseníase, reforçando mecanismos epigenéticos finos que regulam a patogênese da doença. Mais estudos serão importantes para fundamentar esses dados, fornecendo marcadores prognósticos e potenciais alvos terapêuticos para um melhor manejo dessa doença no futuro.

Em relação ao objetivo 3, trazemos um panorama até então inédito sobre fatores clínicos e demográficos da população atendida em dois centros de referência para tratamento da hanseníase no estado da Bahia. Nossos dados corroboram com outros já publicados em outras regiões, que mostram a realidade social de uma doença negligenciada e de difícil diagnóstico, especialmente em cidades de pequeno porte, o que ocasiona um diagnóstico tardio, que contribui para o aumento do número de reações,

incapacidades, assim como dificuldades na quebra do ciclo de transmissão. É também claro, que as populações mais vulneráveis do ponto de vista social desenvolvem as formas mais graves (MAROTTA *et al.*, 2020; AVANZI *et al.*, 2020, ALVES *et al.*, 2017). O presente estudo correlacionou as condições socioeconômicas e com as formas clínicas da hanseníase. Observamos um maior número de pacientes MB do sexo masculino. Isso corrobora com outros dados que também relatam maior prevalência da hanseníase na forma clínica MB em homens (ALVES *et al.*, 2017; HUSSEIN *et al.*, 2010; SARKAR, PRADHAN, 2016).

Parte dos pacientes analisados no estudo apresentaram alergias e isso foi significativamente maior no grupo PB. Os achados de ELLERTSEN *et al.*, 2005, mostram que pacientes com hanseníase tem altos níveis de marcadores de alergia e atribui isso fato de os pacientes terem uma resposta do tipo Th2 e possuem altos níveis de IgE. Consistente com isso, dados de uma população do Nordeste do Brasil também mostrou que pacientes com hanseníase apresentam maior percentual de atopia e asma em relação a contactantes (TENÓRIO *et al.*, 2023). No caso deste estudo não pareceu haver diferença entre pacientes PB e MB. No nosso caso, embora essa diferença não seja tão grande, (16 % vs 24%) ela foi significativa e poderia talvez ser atribuída a uma menor exposição a antígenos com propriedades imunomoduladoras (a exemplo de helmintos) e que de alguma forma torna esse grupo mais hipersensibilizado para o ambiente. Com as outras doenças de base anotadas, não houve diferenças entre ser PB ou MB.

Como já previsto, a massiva maioria de pacientes com IB negativo se concentra no grupo PB, da mesma forma que em relação as reações hanseníacas, os pacientes MB são mais propensos a ocorrência de ENH e os pacientes PB tem uma menor chance de ter reações, tanto a RR quanto a ENH. Pacientes MB possuem lesões de pele em grandes quantidades, uma alta carga bacilar, baixa imunidade celular e tendência a expressar uma

resposta do tipo Th2. Durante o tratamento os pacientes podem apresentar uma resposta aguda e inflamatória devido a um desequilíbrio da resposta imune do paciente e a hipersensibilidade ao antígeno do *M. leprae*, principalmente em pacientes MB que tem essa baixa imunidade. Em concordância com os resultados encontrado, MAYMONE *et al.*, 2020, relata através de estudos prévios que pacientes do polo MB tem propensão a desenvolver as reações hansenícas (GASCHIGNARD *et al.*, 2016; WALKER, LOCKWOOD, 2006; MUNGROO *et al.*, 2020; MAYMONE *et al.*, 2020; KAMATH *et al.*, 2014).

Em relação aos indicadores de perfil socioeconômico, observamos que os pacientes MB, que concentram as formas mais graves da doença e maior número de reações, há significativamente menor grau de escolaridade, menor renda familiar, assim como maior número de casos da doença na família. Esses dados são similares aos do estudo de ALVES *et al.*, 2017, assim como relatados na literatura. Diferentes estudos apontam que condições individuais e socioeconômicas da população, como estado nutricional, situação de higiene e de moradia influenciam na transmissão da hanseníase, dificultando o seu controle. (SAVASSI, 2010; MINUZZO, 2008; DUCATTI, 2009). Portanto, faz-se importante que os protocolos de intervenções clínicas se integrem a medidas de melhoria das condições de vida da população para uma efetiva política de controle da doença, uma vez que sua ocorrência está diretamente relacionada às desigualdades sociais, atingindo com muito mais intensidade as populações socialmente vulneráveis.

X. CONCLUSÃO

Os dados fornecidos neste estudo sugerem um papel regulador dos miRNAs em parâmetros imunológicos da hanseníase, reforçando a ideia de que mecanismos epigenéticos interferem na patogênese dessa doença. Entretanto, estudos funcionais serão importantes para validar melhor esses dados. Em relação ao estudo epidemiológico, similarmente a outras regiões do Brasil e do mundo, reforçamos que as formas mais graves e reacionais da hanseníase ocorrem dentro de um contexto social de maior escassez educacional e financeira e, portanto, de maior vulnerabilidade social.

XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHUTHAN A, MASENDY CZ P, LOPEZ JA et al., **Regulation of the endosomal SNARE protein syntaxin 7 by colony-stimulating factor 1 in macrophages.** *Mol Cell Biol.* 2008;28(20):6149-6159. doi:10.1128/MCB.00220-08

ALVES ACR, LEMOS GS, PAIVA PDR, **Perfil socioeconômico dos pacientes atendidos pelo Centro de Referência em Reabilitação da Hanseníase da Zona da Mata Mineira.** *HU Rev,* 2017; 43(2):99-104.

AN W, YAO S, SUN X, *et al.*, **Glucocorticoid modulatory element-binding protein 1 (*GMEB1*) interacts with the de-ubiquitinase *USP40* to stabilize *CFLAR_L* and inhibit apoptosis in human non-small cell lung cancer cells.** *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38(1):181. Published 2019 May 2. doi:10.1186/s13046-019-1182-3

ARAI M, GENDA Y, ISHIKAWA M, SHUNSUKE T, OKABE T, SAKAMOTO A, **The miRNA and mRNA changes in rat hippocampi after chronic constriction injury.** *Pain Med,* 2013, 14(5):720-9. doi: 10.1111/pme.12066.

AVANZI C, SINGH P, TRUMAN RW, SUFFYS PN, **Molecular epidemiology of leprosy: An update.** *Infect Genet Evol,* 2020 Dec;86:104581. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104581. Epub 2020 Oct 4. PMID: 33022427.

BARBOSA MGdeM, SILVA BJdeA, ASSIS TQ, PRATA RBdaS, FERREIRA H, ANDRADE PR, OLIVEIRA JAdaPde, SILVA GMSda, NERY JAdaC, SARNO EM, PINHEIRO RO, **Autophagy Impairment Is Associated With Increased Inflammasome Activation and Reversal Reaction Development in Multibacillary Leprosy.** *Front. Immunol.* 2018, 9:1223. <http://doi:10.3389/fimmu.2018.01223>

BARTEL DP, **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell*, v. 116, p. 281- 297, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)

BELACHEW WA, NAAFS B, **Position statement: LEPROSY: Diagnosis, treatment and follow-up.** 03 April 2019. <https://doi.org/10.1111/jdv.15569>

BERTHELOOT D, LATZ E, FRANKLIN BS, **Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death.** *Cell Mol Immunol.* 2021 May;18(5):1106-1121. Epub 2021 Mar 30. PMID: 33785842; PMCID: PMC8008022. doi: 10.1038/s41423-020-00630-3.

BHANDARI J, AWAIS M, ROBBINS BA, GUPTA V, **Leprosy.** In: *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559307/>

BOLDIN MP, TAGANOV KD, RAO DS, YANG L, ZHAO JL, KALWANI M *et al.*, **miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice.** *J Exp Med* 2011; 208(6):1189-201. doi: 10.1084/jem.20101823.

____.BRASIL, **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase**, 2022.

Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/protocolos/20220818_pcdt_hansenise.pdf

____.BRASIL, **Leprosy Epidemiological Record 2023**, 2023, Número Especial, Jan, 2023. ISSN: 9352-7864. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2023/boletim_hansenise-2023_internet_completo.pdf/view

____.BRASIL, **Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância e**

Doenças Transmissíveis, 2017. Disponível em:

https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_hansenise.pdf

____.BRASIL, **SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÃO E INSUMOS ESTRATÉGICOS EM SAÚDE**, 2022. https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/protocolos/20220818_pcdt_hansenise.pdf

BRITO de SOUZA VN, IYER AM, LAMMAS DA, NAAFS B, DAS PK, **Advances in leprosy immunology and the field application: A gap to bridge.** Clin Dermatol. 2016 Jan-Feb;34(1):82-95. doi: 10.1016/j.clindermatol.2015.10.013. Epub 2015 Nov 6. PMID: 26773628.

BROUWER I, LENSTRA TL, **Visualizing transcription: key to understanding gene expression dynamics,** Current Opinion in Chemical Biology, Volume 51, 2019, Pages 122-129, ISSN 1367-5931, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.05.031>.

CASTELLUCCI LC, ALMEIDA L, CHERLIN S *et al.*, **A Genome-wide Association Study Identifies *SERPINB10*, *CRLF3*, *STX7*, *LAMP3*, *IFNG-AS1*, and *KRT80* As Risk Loci Contributing to Cutaneous Leishmaniasis in Brazil.** Clin Infect Dis. 2021;72(10):e515-e525. doi:10.1093/cid/ciaa1230

CEZAR-de-MELLO PF, TOLEDO-PINTO TG, MARQUES CS, ARNEZ LE, CARDOSO CC, GUERREIRO LT, ANTUNES SL, JARDIM MM, COVAS Cde J, ILLARAMENDI X, DIAS-BAPTISTA IM, ROSA PS, DURÃES SM, PACHECO AG, RIBEIRO-ALVES M, SARNO EN, MORAES MO. **Pre-miR-146a (rs2910164 G>C) single nucleotide polymorphism is genetically and functionally associated with leprosy.** PLoS Negl Trop Dis. 2014 Sep 4;8(9):e3099. <http://doi:10.1371/journal.pntd.0003099>. PMID: 25187983; PMCID: PMC4154665.

CHATTREE V, KHANNA N, BISHT V, RAO DN. **Liposomal delivery of Mycobacterium leprae antigen(s) with murabutide and Trat peptide inhibits Fas-mediated apoptosis of peripheral blood mononuclear cells derived from leprosy patients.** Indian J Biochem Biophys. 2007 Oct;44(5):386-93. PMID: 18341215.

COONEY R, BAKER J, BRAIN O, DANIS B, PICHULIK T, ALLAN P, FERGUSON DJ, CAMPBELL BJ, JEWELL D, SIMMONS A. **NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation.** Nat Med. 2010 Jan;16(1):90-7. <http://doi:10.1038/nm.2069>. Epub 2009 Dec 6. PMID: 19966812.

DIVEP/SESAB, 2023. **Boletim Epidemiológico de Hanseníase - Detecção Geral.** Nº 01 - Janeiro de 2023. Disponível em: https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/boletimHanseniasseGeral_No_01_janeiro2023.pdf

DOMINGOS J, COELHO T, TAIPA R, BASTO JP, MELO-PIRES M, MAGALHÃES MJ, **PARK2** presenting as a disabling peripheral axonal neuropathy. *Neurol Sci.* 2015;36(2):341-343. doi:10.1007/s10072-014-1898-y

DONATE PB, ALVES DE LK, PERES RS, ALMEIDA F, FUKADA SY, SILVA TA *et al.* **Cigarette smoke induces miR-132 in Th17 cells that enhance**

osteoclastogenesis in inflammatory arthritis. Proc Natl Acad Sci USA. 2021;118(1):e2017120118. doi: 10.1073/pnas.2017120118.

DUCATTI I. **A hanseníase no Brasil na era Vargas e a profilaxia do isolamento compulsório: estudos sobre o discurso científico legitimador.** 2009. Tese (Doutorado em História Social) - Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. doi:10.11606/T.8.2009.tde-09032009-171024. Acesso em: 2023-07-19.

EBENEZER GJ, SCOLLARD DM. **Treatment and Evaluation Advances in Leprosy Neuropathy.** *Neurotherapeutics* 18, 2337–2350 (2021). <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01153-z>. Epub 2021 Nov 19. PMID: 34799845; PMCID: PMC8604554

ELLERTSEN LK, WIKER HG, EGEBERG NT, HETLAND G; **Allergic Sensitisation in Tuberculosis and Leprosy Patients.** *Int Arch Allergy Immunol* 1 November 2005; 138 (3): 217–224. <https://doi.org/10.1159/000088722>

FAIZ A, HEIJINK IH, VERMEULEN CJ, *et al.*, **Cigarette smoke exposure decreases CFLAR expression in the bronchial epithelium, augmenting susceptibility for lung epithelial cell death and DAMP release.** *Sci Rep.* 2018;8(1):12426. Published 2018 Aug 20. doi:10.1038/s41598-018-30602-7

FANG L, WU HM, DING PS, LIU RY. **TLR2 mediates phagocytosis and autophagy through JNK signaling pathway in Staphylococcus aureus-stimulated RAW264.7 cells.** Cell Signal. 2014 Apr;26(4):806-14. <http://doi:10.1016/j.cellsig.2013.12.016>. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24412754.

FARAG AGA, LABEEB AZ, GERGES ANA, ELSHAIB ME. **Interleukin-17A in Egyptian leprosy patients: a clinical, genetic, and biochemical study.** Anais Brasileiros de Dermatologia, Volume 97, Issue 6, 2022. Pages 735-741, ISSN 0365-0596, <https://doi.org/10.1016/j.abd.2021.09.016>.

FAVA VM, DALLMANN-SAUER M, SCHURR E. **Genetics of leprosy: today and beyond.** Hum Genet. 2020; 139(6-7):835-846. doi: 10.1007/s00439-019-02087-5.

FROES JUNIOR LAR, SOTTO MN, TRINDADE MAB. **Leprosy: clinical and immunopathological characteristics.** Anais Brasileiros de Dermatologia, Volume 97, Issue 3, 2022, Pages 338-347, ISSN 0365-0596, <https://doi.org/10.1016/j.abd.2021.08.006>.

FULCO TdeO, ANDRADE PR, BARBOSA MGdeM, PINTO TG, FERREIRA PF, FERREIRA H, NERY JAdaC, REAL SC, BORGES VM, MORAES MO, SARNO EN, SAMPAIO EP, PINHEIRO RO. **Effect of apoptotic cell recognition on macrophage polarization and mycobacterial persistence.** Infect Immun. 2014

Sep;82(9):3968-78. <http://doi:10.1128/IAI.02194-14>. Epub 2014 Jul 14. PMID: 25024361; PMCID: PMC4187838.

GASCHIGNARD J, GRANT AV, THUC NV, ORLOVA M, COBAT A, HUONG NT, BA NN, THAI VH, ABEL L, SCHURR E, ALCAÏS A. 2016. **Pauci- and Multibacillary Leprosy: Two Distinct, Genetically Neglected Diseases.** PLoS Negl Trop Dis 10(5): e0004345. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004345>

GENG J, KLIONSKY DJ. **The ATG8 and ATG12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series.** EMBO Rep. 2008 Sep;9(9):859-64. doi: 10.1038/embor.2008.163. PMID: 18704115; PMCID: PMC2529362.

HA M, KIM VN. **Regulation of microRNA biogenesis.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2014 Aug;15(8):509-24. doi: 10.1038/nrm3838. Epub 2014 Jul 16. PMID: 25027649.

HAN XY, SEO YH, SIZER KC *et al.*, **A new Mycobacterium species causing diffuse lepromatous leprosy.** *Am J Clin Pathol.* 2008;130(6):856-864. doi:10.1309/AJCPP72FJZZRRVMM

HASAN Z, ASHRAF M, TAYYEBI A, HUSSAIN R. ***M. leprae* inhibits apoptosis in THP-1 cells by downregulation of Bad and Bak and upregulation of Mcl-1**

gene expression. BMC Microbiol. 2006 Sep 18;6:78. <http://doi:10.1186/1471-2180-6-78>. PMID: 16978419; PMCID: PMC1592106.

HASTINGS RC, GILLIS TP, KRAHENBUHL JL, FRANZBLAU SG. **Leprosy.** Clin Microbiol Rev. 1988 Jul;1(3):330-48. doi: 10.1128/CMR.1.3.330. PMID: 3058299; PMCID: PMC358054.

HUSSEIN A, Mohammed H, Eltahir A, A.Sidig, Gadour MOH. 2010. **Frequency of neurological deficits in Sudanese lepromatic patients.** Vol. 5, N°. 1, Mar 2010. <http://doi:10.4314/sjms.v5i1.56025>

JACOB JT, FRANCO-PAREDES C. **The Stigmatization of Leprosy in India and Its Impact on Future Approaches to Elimination and Control.** PLoS Negl Trop Dis 2(1): e113. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000113>. 2008

JORGE KTOS, SOUZA RP, ASSIS MTA, ARAÚJO MG, LOCATI M, JESUS AMR, DIAS BAPTISTA IMF, LIMA CX, TEIXEIRA AL, TEIXEIRA MM, SORIANI FM. 2017. **Characterization of microRNA expression profiles and identification of potential biomarkers in leprosy.** J Clin Microbiol 55:1516–1525. <https://doi.org/10.1128/JCM.02408-16>.

JUNIOR FLAR, SOTTO MN, TRINDADE MAB. **Leprosy: clinical and immunopathological characteristics.** Anais Brasileiros de Dermatologia, Volume 97, Issue 3, 2022. Pages 338-347, ISSN 0365-0596, <https://doi.org/10.1016/j.abd.2021.08.006>.

KACZYNSKI TJ et al., **Dysregulation of a lncRNA within the TNFRSF10A locus activates cell death pathways.** Cell Death Discov. 2023 Jul 13;9(1):242. doi: 10.1038/s41420-023-01544-5. PMID: 37443108; PMCID: PMC10344863.

KAHAWITA IP, WALKER SL, LOCKWOOD DNJ, **Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum.** An Bras Dermatol. 2008; 83(1):75–82. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962008000100010>

KAMATH S, VACCARO SA, REA TH, OCHOA MT, **Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy.** J Am Acad Dermatol. 2014 Oct;71(4):795-803. doi: 10.1016/j.jaad.2014.03.034. Epub 2014 Apr 24. PMID: 24767732.

KIM JK, YUK JM, KIM SY, KIM TS, JIN HS, YANG CS, JO EK, **MicroRNA-125a Inhibits Autophagy Activation and Antimicrobial Responses during Mycobacterial Infection.** J Immunol. 2015 Jun 1;194(11):5355-65. <http://doi:10.4049/jimmunol.1402557>. Epub 2015 Apr 27. PMID: 25917095.

KIM V, **MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing.** *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 376–385 (2005). <https://doi.org/10.1038/nrm1644>

LIANG J, CAO R, WANG X, ZHANG Y, WANG P, GAO H, LI C, YANG F, ZENG R, WEI P, LI D, LI W, YANG W, **Mitochondrial *PKM2* regulates oxidative stress-induced apoptosis by stabilizing *BCL2*.** *Cell Res.* 2017 Mar;27(3):329-351. doi: 10.1038/cr.2016.159. Epub 2016 Dec 30. PMID: 28035139; PMCID: PMC5339831.

LIAO D, **Chapter 1 - Apoptosis, necroptosis, and pyroptosis in health and disease: an overview of molecular mechanisms, targets for therapeutic development, and known small molecule and biologic modulators.** *Mechanisms of Cell Death and Opportunities for Therapeutic Development* 2022;1-46. doi.org/10.1016/B978-0-12-814208-0.00008-7.

LI H, LI L, QIU X, ZHANG J, HUA Z, **The interaction of *CFLAR* with p130Cas promotes cell migration.** *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2023;1870(2):119390. doi:10.1016/j.bbamcr.2022.119390

LI J, TONG Y, ZHOU Y, *et al.*, **LncRNA *KCNQ1OT1* as a miR-26a-5p sponge regulates *ATG12*-mediated cardiomyocyte autophagy and aggravates myocardial infarction.** *Int J Cardiol.* 2021;338:14-23. doi:10.1016/j.ijcard.2021.05.053

LI T, SU L, LEI Y, LIU X, ZHANG Y, LIU X, **DDIT3 and KAT2A Proteins Regulate TNFRSF10A and TNFRSF10B Expression in Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis in Human Lung Cancer Cells.** J Biol Chem. 2015;290(17):11108-18. doi: 10.1074/jbc.M115.645333.

LIU PT, WHEELWRIGHT M, TELES R, KOMISOPOULOU E, EDFELDT K, FERGUSON B, MEHTA MD, VAZIRNIA A, REA TH, SARNO EN, GRAEBER TG, MODLIN RL, **MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy.** Nat Med. 2012 Jan 29;18(2):267-73. <http://doi:10.1038/nm.2584>. PMID: 22286305; PMCID: PMC3274599.

LOCKWOOD DNJ, **Leprosy.** BMJ Clin Evid. 2007 Apr 1; 2007:0915. PMID: 19454067; PMCID: PMC2943824.

MACHADO PR, MACHADO LM, SHIBUYA M, REGO J, JOHNSON WD, GLESBY MJ, **Viral Co-infection and Leprosy Outcomes: A Cohort Study.** PLoS Negl Trop Dis. 2015 Aug 12;9(8):e0003865. doi: 10.1371/journal.pntd.0003865. PMID: 26267882; PMCID: PMC4534371.

MANZANILLO PS, AYRES JS, WATSON RO, COLLINS AC, SOUZA G, RAE CS *et al.*, **The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens.** Nature 2013;501(7468): 512-516. doi.org/10.1038/nature12566.

MAROTTA M, DALLOLIO L, TONI G, TONI F, LEONI E, **Diagnosis of leprosy in a Nigerian migrant: implementation of surveillance measures in the current migration context.** Ann Ig. 2020 Jul-Aug;32(4):336-343. doi: 10.7416/ai.2020.2357. PMID: 32744292.

MAYMONE MBC, LAUGHTER M, VENKATESH S, DACSO MM, RAO PN, STRYJEWSKA BM, HUGH J, DELLAVALLE RP, DUNNICK CA, **Leprosy: Clinical aspects and diagnostic techniques.** J Am Acad Dermatol. 2020 Jul;83(1):1-14. doi:10.1016/j.jaad.2019.12.080. Epub 2020 Mar 27. PMID: 32229279.

METLAPALLY R, GONZALEZ P, HAWTHORNE FA, TRAN-VIET K-N, WILDSOET CF, YOUNG TL, **Scleral Micro-RNA Signatures in Adult and Fetal Eyes.** PLoS ONE, 2013, 8(10): e78984. <http://doi:10.1371/journal.pone.0078984>

MINUZZO DA, **O Homem Paciente de Hanseníase (Lepra): Representação Social, Rede Social Familiar, Experiência e Imagem Corporal.** 140 f. Dissertação (Mestrado em Políticas de Bem-Estar em perspectiva: evolução, conceitos e actores), Universidade de Évora, Évora, 2008.

MI Z, LIU H, ZHANG F, **Advances in the Immunology and Genetics of Leprosy.** Sec. Microbial Immunology. Front. Immunol., 16 April 2020. Volume 11 - 2020 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00567>

MIZUNO Y, **More than 20 years of the discovery of *PARK2***. *Neuroscience Research*, Volume 159, 2020, Pages 3-8, ISSN 0168-0102, <https://doi.org/10.1016/j.neures.2020.02.002>.

MIZUSHIMA N, **The *ATG* conjugation systems in autophagy**. *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 63, 2020, Pages 1-10, ISSN 0955-0674, <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.12.001>

MOHR R, ÖZDIRIK B, LAMBRECHT J, DEMIR M, ESCHRICH J, GEISLER L, HELLBERG T, LOOSEN SH, LUEDDE T, TACKE F, HAMMERICH L, RODERBURG C, **From Liver Cirrhosis to Cancer: The Role of Micro-RNAs in Hepatocarcinogenesis**. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(3):1492. <https://doi.org/10.3390/ijms22031492>

MOHAMMAD AS, MARIAM A AL-FADHLI, JAFAR AQ, **Diabetic status of patients with leprosy in Kuwait**. *Journal of Infection and Public Health*, Volume 5, Issue 5, 2012, Pages 360-365, ISSN 1876-0341, <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2012.08.001>

MORI K *et al.*, ***TNFRSF10A* downregulation induces retinal pigment epithelium degeneration during the pathogenesis of age-related macular degeneration and central serous chorioretinopathy**. *Hum Mol Genet*. 2022 Jul 7;31(13):2194-2206. doi: 10.1093/hmg/ddac020. PMID: 35103281.

MUNGROO MR, KHAN NA, SIDDIQUI R, **Mycobacterium leprae: Pathogenesis, diagnosis, and treatment options.** Microbial Pathogenesis, Volume 149, 2020, 104475, ISSN 0882-4010, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104475>.

MURCHISON EP, HANNON GJ, **miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery.** Current Opinion in Cell Biology, Volume 16, Issue 3, 2004. Pages 223-229, ISSN 0955-0674, <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.04.003>.

MURROW L, DEBNATH J, **ATG12-ATG3 connects basal autophagy and late endosome function.** Autophagy. 2015;11(6):961-2. doi: 10.1080/15548627.2015.1040976. PMID: 25998418; PMCID: PMC4502820.

NATH I, SAINI C, VALLURI VL, **Immunology of leprosy and diagnostic challenges.** Clinics in Dermatology, Volume 33, Issue 1, 2015. Pages 90-98, ISSN 0738-081X, <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.07.005>.

O'CONNELL RM, RAO DS, BALTIMORE D, **microRNA regulation of inflammatory responses.** Annu Rev Immunol. 2012;30:295-312. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075013. Epub 2012 Jan 3. PMID: 22224773.

O'NEILL LA, SHEEDY FJ, MCCOY CE, **MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling.** *Nat Rev Immunol* 2011;11(3):163-75. doi: 10.1038/nri2957.

OLIVEIRA RB, OCHOA MT, SIELING PA, REA TH, RAMBUKKANA A, SARNO EN, MODLIN RL, **Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy.** *Infect Immun*, 2003 Mar;71(3):1427-33. <http://doi:10.1128/IAI.71.3.1427-1433.2003>. PMID: 12595460; PMCID: PMC148832.

PARVEEN S, KHAMARI A, RAJU J, COPPOLINO MG, DATTA S, **Syntaxin 7 contributes to breast cancer cell invasion by promoting invadopodia formation.** *J Cell Sci.* 2022;135(12):jcs259576. doi:10.1242/jcs.259576

PATTU V, QU B, MARSHALL M, BECHERER U, JUNKER C, MATTI U, *et al.*, **Syntaxin7 is required for lytic granule release from cytotoxic T lymphocytes.** *Traffic* 2011;12(7):890-901. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01193.x.

PENG Y, CROCE C, **The role of MicroRNAs in human cancer.** *Sig Transduct Target Ther* **1**, 15004 (2016). <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>

PERRY MM, MOSCHOS SA, WILLIAMS AE, SHEPHERD NJ, LARNER-SVENSSON HM, LINDSAY MA, **Rapid changes in microRNA-146a expression**

negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. J Immunol 2008;180(8):5689-98. doi: 10.4049/jimmunol.180.8.5689.

PRAGASAM V, VASUDEVAN B, MOORCHUNG N, **Cytokine gene polymorphisms in type I and type II reactions in Hansen's disease.** Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2020 Sep-Oct;86(5):482-488. doi: 10.4103/ijdvl.IJDVL_619_18. PMID: 32372760.

RADOSHEVICH L, DEBNATH J, **ATG12-ATG3 and mitochondria.** Autophagy. 2011 Jan;7(1):109-11. doi: 10.4161/auto.7.1.13998. Epub 2011 Jan 1. PMID: 21068544; PMCID: PMC3039733.

RANDHAWA A, KAPILA R, AND SCHWARTZ RA, **Leprosy: what is new.** Int J Dermatol, 2022, 61: 733-738. <https://doi.org/10.1111/ijd.15998>

RÊGO JL, **Genes de resposta imune no desenvolvimento de episódios reacionais na hanseníase.** 2018. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal da Bahia.

RÊGO JL, SANTANA NL, AGUIAR ER, QUEIROZ IS, CARVALHO LP, MACHADO PRL, *et al.*, **Serum immune markers as triggers of reactional**

episodes in multibacillary patients with leprosy. *Leprosy Review* 2020;91(4), 393-402. doi:10.47276/lr.91.4.393.RIBEIRO MDA, SILVA JCA, OLIVEIRA SB.

Estudo epidemiológico da hanseníase no Brasil: reflexão sobre as metas de eliminação. *Rev Panam Salud Publica.* 2018;42:e42.

<https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.42>

RIDLEY DS, JOPLING WH, **Classification of leprosy according to immunity. A five-group system.** *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966;34(3):255-73. PMID: 5950347.

ROCHA DC, GARCÊS-FILHO AQ, CUNHA AMA, MONTE RC, OLIVEIRA IS, FERREIRA IG, MONTEIRO WM, CERNI FA, PUCCA MB, **Leprosy Overview: Pathophysiology, Immune Responses, and Epidemiology in Brazil.** *Biomed J Sci & Tech Res* 48(4)-2023. BJSTR. MS.ID.007676.

<http://doi.org/10.26717/BJSTR.2023.48.007676>

RODRIGUES de SOUSA J, MAGNO FALCÃO LF, VIRGOLINO GL, *et al.*, **Different cell death mechanisms are involved in leprosy pathogenesis.** *Microb Pathog.* 2022;166:105511. doi:10.1016/j.micpath.2022.105511

RODRIGUES JÚNIOR IA, GRESTA LT, NOVIELLO MDE L, CARTELLE CT, LYON S, ARANTES RM, **Leprosy classification methods: a comparative study**

in a referral center in Brazil. *Int J Infect Dis.* 2016;45:118-122.
doi:10.1016/j.ijid.2016.02.018

RUBINSTEIN AD, EISENSTEIN M, BER Y, BIALIK S, KIMCHI A, **The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis.** *Mol Cell.* 2011;44(5):698-709. doi: 10.1016/j.molcel.2011.10.014.

SALGADO CG, PINTO P, BOUTH RC, GOBBO AR, MESSIAS ACC, SANDOVAL TV, dos SANTOS AMR, MOREIRA FC, VIDAL AF, GOULART LR, BARRETO JG, da SILVA MB, FRADE MAC, SPENCER JS, SANTOS S, RIBEIRO-dos-SANTOS Â, **miRNome Expression Analysis Reveals New Players on Leprosy Immune Physiopathology.** *Front Immunol.* 2018 Mar 9;9:463.
<http://doi:10.3389/fimmu.2018.00463>. PMID: 29593724; PMCID: PMC5854644.

SARKAR RK, PRADHAN S, **Leprosy and women.** *International Journal of Women's Dermatology*, Volume 2, Issue 4, 2016, Pages 117-121, ISSN 2352-6475.<https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2016.09.001>.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S235264751630020X>

SAVASSI LCM, **Hanseníase: políticas públicas e qualidade de vida de pacientes e seus cuidadores.** 2010. 196 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2010

SCHENK M, KRUTZIK SR, SIELING PA, LEE DJ, TELES RM, OCHOA MT, KOMISOPOULOU E, SARNO EN, REA TH, GRAEBER TG, KIM S, CHENG G, MODLIN RL, **NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy.** Nat Med. 2012 Mar 25;18(4):555-63. <http://doi:10.1038/nm.2650>. PMID: 22447076; PMCID: PMC3348859.

SESAB/DIVEP, **Boletim Epidemiológico Hanseníase - Detecção Geral.** Nº 01, julho de 2022 (dados/2020). Disponível em: https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/boletimHanseniasDeteccaoGeral_No012022_dados2020.pdf

SESAB/DIVEP, **Boletim Epidemiológico Hanseníase - Menores de 15 anos.** Nº 02, julho de 2022 (dados/2020). Disponível em: https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/boletimHanseniasMenor15-anosNo01_2022_dados2021.pdf

SHAN C, CHEN X, CAI H, HAO X, LI J, ZHANG Y, *et al.*, **The Emerging Roles of Autophagy-Related MicroRNAs in Cancer.** Int J Biol Sci 2021;17(1):134-150. doi: 10.7150/ijbs.50773.

SHIBUYA M, BERGHEME G, PASSOS S, QUEIROZ I, RÊGO J, CARVALHO LP, MACHADO PRL, **Evaluation of monocyte subsets and markers of activation**

in leprosy reactions. *Microbes and Infection*, Volume 21, Issue 2, 2019, Pages 94-98. SSN 1286-4579, <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.10.003>.

SHIN DM, YUK JM, LEE HM, LEE SH, SON JW, HARDING CV, KIM JM, MODLIN RL, JO EK, **Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signalling.** *Cell Microbiol.* 2010 Nov;12(11):1648-65. <http://doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01497.x>. Epub 2010 Jul 20. PMID: 20560977; PMCID: PMC2970753.

SILVA BJ, BARBOSA MG, ANDRADE PR, FERREIRA H, NERY JA, CÔRTE-REAL S, SILVA GMda, ROSA PS, FABRI M, SARNO EN, PINHEIRO RO, **Autophagy Is an Innate Mechanism Associated with Leprosy Polarization.** *PLoS Pathog.* 2017 Jan 5;13(1):e1006103. <http://doi:10.1371/journal.ppat.1006103>. PMID: 28056107; PMCID: PMC5215777.

SOUSA JRde, FALCÃO LFM, VIRGOLINO GL, CRUZ MFS, TEIXEIRA VF, AARÃO TLde S, FURLANETO IP, CARNEIRO FRO, AMIN G, FUZII HT, QUARESMA JAS, **Different cell death mechanisms are involved in leprosy pathogenesis.** *Microbial Pathogenesis*, Volume 166, 2022. 105511, ISSN 0882-4010. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105511>.

SOUZA CS, **Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial.** *Medicina (Ribeirão Preto)*, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 325-334, 1997. DOI: 10.11606/issn.2176-

7262.v30i3p325-334.

Disponível

em:

<https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/1185>. Acesso em: 25 maio. 2023.

SOUZA VNBde, IYER AM, LAMMAS DA, NAAFS B, DAS PK, **Advances in leprosy immunology and the field application: A gap to bridge**. Clinics in Dermatology, Volume 34, Issue 1, 2016. Pages 82-95, ISSN 0738-081X. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2015.10.013>.

SIGNOR SA, NUZHDIN SV, **The Evolution of Gene Expression in cis and trans**. Trends Genet. 2018 Jul;34(7):532-544. doi: 10.1016/j.tig.2018.03.007. Epub 2018 Apr 18. PMID: 29680748; PMCID: PMC6094946

SINGH A, ANANG V, VERMA C, SARASWATI S, RANA A, BANDYOPADHYAY U, CHADHA A, NATARAJAN K, **BCL2 negatively regulates Protective Immune Responses During Mycobacterial Infection**. *Biomolecular Concepts*. 2021;12(1): 94-109. <https://doi.org/10.1515/bmc-2021-0010>

SI W, SHEN J, ZHENG H, FAN W, **The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance**. *Clin Epigenet* 11, 25 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0587-8>

SUN YM, LIN KY, CHEN YQ, **Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts.** J Hematol Oncol. 2013 15;6:6. doi: 10.1186/1756-8722-6-6.

TAMGUE O, MEZAJOU CF, NGONGANG NN, KAMENI C, NGUM JA, SIMO USF, TATANG FJ, AKAMI M, NGONO NA, **Non-Coding RNAs in the Etiology and Control of Major and Neglected Human Tropical Diseases.** Front Immunol. 2021 Oct 19;12:703936. doi: 10.3389/fimmu.2021.703936. PMID: 34737736; PMCID: PMC8560798.

TENÓRIO MDL, ARAUJO JMS, MELO EVde, CAZZANIGA RA, ARAGÃO AF, VALOIS LQ, SEVERO J, SANTOS-FILHO MAA, MENEZES-SILVA L, MACHADO JA, REED SG, DUTHIE MS, ALMEIDA RPde, BEZERRA-SANTOS M, JESUS ARde, **Association between asthma, rhinitis and atopic dermatitis with leprosy: A case-control study.** Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2023 Feb 2:1-8. doi: 10.25259/IJDVL_347_2021. Epub ahead of print. PMID: 37067141.

TIJERO B *et al.*, **Autonomic involvement in Parkinsonian carriers of *PARK2* gene mutations.** Parkinsonism Relat Disord. 2015 Jul;21(7):717-22. doi: 10.1016/j.parkreldis.2015.04.012. Epub 2015 Apr 23. PMID: 25960264.

UDDIN S, MUNIR MZ, GULL S, KHAN AH, KHAN A, KHAN D, KHAN MA, WU Y, SUN Y, LI Y, **Transcriptome Profiling Reveals Role of MicroRNAs and Their Targeted Genes during Adventitious Root Formation in Dark-Pretreated**

Micro-Shoot Cuttings of Tetraploid Robinia pseudoacacia L. *Genes* 2022, 13, 441. <https://doi.org/10.3390/genes13030441>

VALENCIA-SANCHEZ MA, LIU J, HANNON GJ, PARKER R, **Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs.** *Genes Dev.* 2006 Mar 1;20(5):515-24. doi: 10.1101/gad.1399806. PMID: 16510870.

VOGLER M. **Targeting BCL2-Proteins for the Treatment of Solid Tumours.** *Adv Med.* 2014;2014:943648. doi: 10.1155/2014/943648. Epub 2014 Aug 27. PMID: 26556430; PMCID: PMC4590949.

VON MOSTERT HR, **The classification of leprosy (an historical survey of the problem with comments on the recent system proposed at Madrid).** *Cent Afr J Med.* 1956 Jun;2(6):225-33. PMID: 13356306.

YONEMOTO ACF, CHOPTIAN JÚNIOR MC, MATTARA VAdeO, ABREU MAMMde, **Pathophysiology of leprosy: immunological response related to clinical forms.** *Research, Society and Development, [S. l.], v. 11, n. 9, p. e42211932058, 2022. <http://doi10.33448/rsd-v11i9.32058>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/32058>. Acesso em: 25 may. 2023.*

WALKER SL, LOCKWOOD DNJ, **The clinical and immunological features of leprosy.** *British Medical Bulletin*, Volume 77-78, Issue 1, 2006, Pages 103–121, <https://doi.org/10.1093/bmb/1d1010>

WANG DD *et al.*, **Long noncoding RNA *TNFRSF10A-AS1* promotes colorectal cancer through upregulation of HuR.** *World J Gastroenterol*. 2022 May 28;28(20):2184-2200. doi: 10.3748/wjg.v28.i20.2184. PMID: 35721888; PMCID: PMC9157619.

WANG H, FRELIN L, PEVSNER J, **Human syntaxin 7: a Pep12p/Vps6p homologue implicated in vesicle trafficking to lysosomes.** *Gene*, 1997;199(1-2):39-48. doi: 10.1016/s0378-1119(97)00343-0.

____. WHO, 2016. **Operational Manual 2016 – Global Leprosy Strategy 2016–2020. Accelerating towards a leprosy-free world.** Guideline 15 August 2016. ISBN: 978 92 9022 525 6. Disponible em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789290225256>

____. WHO, 2019. **Global leprosy (Hansen disease) update, 2019: time to step-up prevention initiatives.** *Weekly epidemiological record*, 3 September 2020. WHO REFERENCE NUMBER: WER No 36, 2020, 95, 417–440. Disponible em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9536>

____. WHO, 2020. **Lepra/Hanseníase: Gestão das reacções e prevenção das incapacidades. Orientações técnicas.** Disponível em: <https://www.who.int/pt/publications/i/item/9789290227595>

____. WHO, 2021. **Estratégia Global de Hanseníase 2021–2030 – “Rumo à zero hanseníase”.** ISBN: 978 92 9022842 4. Disponível em: <https://www.who.int/pt/publications/i/item/9789290228509>

____. WHO, 2022. **Leprosy - Number of leprosy cases: 2021.** Disponível em: https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leprosy/leprosy.html

WILLIAMS AE, PERRY MM, MOSCHOS SA, LARNER-SVENSSON HM, LINDSAY MA, **Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer.** *Biochem Soc Trans* 2008;36(6):1211-5. doi: 10.1042/BST0361211.

WU J, ZHANG H, YANG L, CHEN Y, LI J, YANG M, ZHANG X, HE C, WANG X, XU X, **Syntaxin 7 modulates seizure activity in epilepsy.** *Neurobiology of Disease*, Volume 181, 2023, 106118, ISSN 0969-9961, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106118>.

ZHANG R, HUANG M, CAO Z, QI J, QIU Z, CHIANG LY, **MeCP2 plays an analgesic role in pain transmission through regulating CREB / miR-132 pathway.** Mol Pain 2015;(12)11-19. doi:10.1186/s12990-015-0015-4.

ZHAO JL, RAO DS, BOLDIN MP, TAGANOV KD, O'CONNELL RM, BALTIMORE D, **NF-kappaB dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies.** Proc Natl Acad Sci USA 2011;108(22):9184-9. doi: 10.1073/pnas.1105398108.

XII. ANEXOS

XII.1. ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Estudo: Avaliação da Expressão de miRNAs Envolvidos na Regulação de Genes Participantes da Resposta Imune ao *Mycobacterium leprae* Identificados a Partir de um Estudo de Expressão Gênica

Pesquisador Responsável: Léa Cristina de Carvalho Castellucci

O (A) Senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o (a) senhor (a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pelo estudo ou com um membro da equipe desta pesquisa para esclarecê-los.

A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

OBSERVAÇÃO: Caso o paciente não tenha condições de ler e/ou compreender este TCLE, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da família ou responsável legal pelo paciente.

Objetivo do Estudo

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo que tem como objetivo avaliar a associação entre genes e as manifestações da Hanseníase. Caso você concorde em participar do estudo, além de ser examinado por um médico clínico e realizar biópsia de pele, que são métodos necessários para o diagnóstico da doença, você doará 10 ml de sangue para a pesquisa da influência dos genes nas manifestações da hanseníase. A retirada do pedaço da pele para o diagnóstico da sua doença, caso necessário, será feita com anestesia para você não sentir dor e parte deste material será utilizado para esta

pesquisa. Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico.

Duração do Estudo

A duração total do estudo é quatro anos.

A sua participação no estudo será de apenas um (1) dia, ou de dois (2) dias caso o Senhor (a) durante ou após o tratamento venha a desenvolver um episódio inflamatório a que chamamos de *reações hansênicas*.

Descrição do Estudo

Participação do estudo: Aproximadamente 90 indivíduos.

Este estudo será realizado no Ambulatório de Hanseníase do Hospital Universitário Professor Edgard Santos e no Hospital Couto Maia, ambos são centros de referência para o tratamento e acompanhamento da hanseníase no estado da Bahia.

O (a) Senhor (a) foi escolhido (a) a participar do estudo porque é paciente matriculado no Ambulatório Magalhães Neto ou no Hospital Couto Maia e está em tratamento e acompanhamento por uma equipe médica. O (a) Senhor (a) não poderá participar do estudo se possuir alguma limitação física que o (a) impeça de participar como alguns tipos de doença ou gestação.

Procedimento do Estudo

Após entender e concordar em você doará 10ml de sangue venoso (o equivalente a uma colher de sopa), que será coletado por profissional capacitado, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis. Deste material, células e o soro serão avaliados. Se o seu médico julgar pertinente a realização de uma biópsia da sua lesão, solicitaremos a doação de um pedaço pequeno da sua pele para o nosso estudo. Esse procedimento é feito com anestesia e exclusivamente pelo seu médico. Este material ficará guardado em laboratório e será identificado por um código. Não será de forma alguma identificado pelo seu nome. Assim, seu material pode auxiliar o desenvolvimento desta e de outras pesquisas futuras nessa área. Como o material será coletado para fins de pesquisa, não há nenhuma influência dos procedimentos realizados no seu diagnóstico ou tratamento não havendo, portanto, necessidade da liberação de laudo. Entretanto, se for do seu desejo, a equipe lhe fornecerá um relatório em que consta a utilização do material pelo tempo até então decorrido.

Riscos Potenciais. Efeitos Colaterais e Desconforto

A retirada de sangue venoso é um procedimento médico de rotina e, em alguns casos pode provocar dor leve e sangramento ou pequeno hematoma após a retirada da agulha. Raramente podem acontecer desmaios. Caso isso aconteça, todos os cuidados serão tomados por profissionais devidamente habilitados. Os riscos relativos à realização da biópsia incluem sangramento e infecções. As chances de essas complicações acontecerem são pequenas. Caso algum desses eventos ocorra você terá assistência imediata do médico e será tratado com medicamento ou procedimento adequado para cada caso, sem nenhum custo para você. No caso de infecção será tratado com o antibiótico adequado.

Benefícios para o participante

Não há benefícios diretos pela sua participação na pesquisa. Este estudo visa avaliar o papel da genética no desenvolvimento da Hanseníase ou de episódios reacionais. O conhecimento preciso dessa interação poderá resultar no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento da doença e principalmente dos episódios reacionais.

Compensação

Você não receberá nenhuma compensação para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional.

Participação Voluntária/ Desistência do Estudo

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser.

A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração no seu acompanhamento médico tão pouco alterará a relação da equipe médica com você. Após assinar o consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição.

Novas Informações

Quaisquer novas informações que possam afetar a sua segurança ou influenciar sua decisão de continuar a participação no estudo serão fornecidas a você por escrito. Se você

decidir continuar nesse estudo, terá que assinar um novo (revisado) Termo de Consentimento informado para documentar seu conhecimento sobre novas informações.

Em Caso de Danos Relacionados à Pesquisa

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei. Os registros médicos que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis pelo estudo nesta instituição são Dra. Léa Castellucci e Dr. Paulo Roberto Machado que poderão ser

encontrados no endereço: Rua Augusto Viana, S/N, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Serviço de Imunologia, 50 andar ou nos respectivos telefones: 71-3234-7353 ou 3283-8114/8116

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar:

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: DRA. LÉA CASTELLUCCI

ENDEREÇO: Rua Augusto Viana, S/N. Hospital Universitário Professor Edgard Santos.

SALA: Serviço de Imunologia ANDAR: 5

HORÁRIOS DE ATENDIMENTO: SEGUNDA A SEXTA, DAS 9:00 ÀS 17:00HS

SALVADOR (BA) - CEP: 40110-170

FONE: (71) 3237-7353 / E-MAIL: SERVICODEIMUNO@GMAIL.COM

CEP/HUPES- COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS- UFBA

SALVADOR (BA) - CEP: 4011060

FONE: (71) 3283-8043 / E-MAIL: cep.hupes@gmail.com

Declaração de Consentimento

Concordo em participar do estudo intitulado: "Avaliação da Expressão de miRNAs Envolvidos na Regulação de Genes Participantes da Resposta Imune ao *Mycobacterium leprae* Identificados a Partir de um Estudo de Expressão Gênica"

Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Tive oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa. Entendo que ao assinar esse documento, não estou abdicando de nenhum dos meus direitos legais.

Eu autorizo a utilização de meus registros médicos (prontuário médico) pelo pesquisador, autoridades regulatórias e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição.

_____ Nome do Sujeito de Pesquisa Letra de Forma ou à Máquina	_____ Data
_____ Assinatura do Sujeito de Pesquisa	
_____ Nome do Representante Legal do Sujeito de Pesquisa Letra de Forma ou à Máquina (quando aplicável)	_____ Data
_____ Assinatura do Representante Legal do Sujeito de Pesquisa (quando aplicável)	
_____ Nome da pessoa obtendo o Consentimento	_____ Data
_____ Assinatura da Pessoa Obtendo o Consentimento	
_____ Nome do Pesquisador Principal	_____ Data
_____ Assinatura e Carimbo do Pesquisador Principal	

XII.2. ANEXO 2 - Modelo da Ficha clínica e questionário – PACIENTES

Modelo da Ficha clínica e questionário – PACIENTES



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR EDGARD SANTOS
AMBULATÓRIO DE HANSENÍASE
SERVIÇO DE IMUNOLOGIA



AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E MARCADORES GENÉTICOS EM HANSENÍASE

FICHA CLÍNICA

A – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

- 1- INICIAIS – RG HUPES: _____
- 2- DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____
- 3- IDADE: _____ ANOS
- 4- GÊNERO: a. Masculino () b. Feminino ()
- 5- FOTOTIPO (fitzpatrick): a. I () b. II () c. III () d. IV () e. V () f. VI ()
- 6- PROFISSÃO: _____ 7- TELEFONE: _____
- 8- COMUNICANTE COM M.H.: () Sim () Não Quantos? _____

B – DADOS CLÍNICOS

- 1-MÊS E ANO DE DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE: _____
- 2-CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE: a. I () b. TT () c. BT () d. BB () e. BL () f. LL ()
- 3-SURTO REACIONAL: a) Tipo I () b) Tipo II () c) não classificado () d) não ()
- 4-BACILOSCOPIA: a) Negativa () b) Positiva () IB= _____
- 5- AP: _____
- 6-APRESENTA OUTRAS DOENÇAS CRÔNICAS? Sim () Não ()
Quais? _____
- 7-ENCONTRA-SE EM USO DE MEDICAMENTOS? Sim () Não ()
Quais? _____
- 8-COLETA DE SANGUE:
- a) Data ____/____/____ PQT: () Sim () Não SR1 () SR2 () sem SR () Pred () Talid ()
ImSup ()
- b) Data ____/____/____ PQT: () Sim () Não SR1 () SR2 () sem SR () Pred () Talid ()
ImSup ()
- c) Data ____/____/____ PQT: () Sim () Não SR1 () SR2 () sem SR () Pred () Talid ()
ImSup ()
- 9- PQT: () MB () PB DATA INÍCIO: ____/____/____ DATA ALTA: ____/____/____
() ESQUEMA ALTERNATIVO. QUAL? _____

10-CARACTERÍSTICAS DO SURTO REACIONAL TIPO 1:

- 1) Neurite Sim Não
 Até 1 Nervos Periféricos > 1 Até 3 Nervos Periféricos > 3 Nervos Periféricos
- 2) Lesão Cutânea Sim Não
Face Tronco MMSS MMII Outros
- 3) Outros Sintomas/Comprometimentos:
 Febre Artrite Edema MMII (nos Pés) Edema MMSS (nas mãos)

11-CARACTERÍSTICAS DO SURTO REACIONAL TIPO 2:

- 1) Neurite Sim Não
 Até 1 Nervos Periféricos > 1 Até 3 Nervos Periféricos > 3 Nervos Periféricos
- 2) Lesão Cutânea Sim Não
Face Tronco MMII MMSS Outros
Tipo: ENH Eritema Polimorfo
Nº de lesões: Até 5 6-10 >10
- 3) Outros Sintomas/Comprometimentos:
 Febre Artrite Edema MMII (nos Pés) Edema MMSS (nas mãos)

I. ESCOLARIDADE:

- |___| **0:** sem escolaridade |___| **1:** I grau incompleto
|___| **2:** I grau completo |___| **3:** II grau incompleto
|___| **4:** II grau completo |___| **5:** III grau incompleto
|___| **6:** III grau completo

II. EPIDEMIOLOGIA

Município de Nascimento: |_____| UF |___|
Residiu em outros municípios por período igual ou superior a 6 meses? |___| **0:** não |___| **1:** sim
Quais? Município |_____| UF |___|
Município |_____| UF |___|
Município |_____| UF |___|

Tempo de moradia no endereço atual:

- |___| **1.** Menos de 6 meses |___| **3.** 1 a 2 anos
|___| **2.** 6 meses a 1 ano |___| **4.** 2 a 5 anos |___| **5.** Mais de 5anos

Total Renda familiar:

- |___| **0.** Sem renda |___| **1.** Até 1 salário mínimo (SM)
|___| **2.** 1 a 2 SM |___| **3.** 2 a 3 SM |___| **4.** 3 a 4 SM |___| **5.** Mais de 4 SM

III. ANTECEDENTES PESSOAIS:

Tuberculose |___| 0: não |___| 1: sim |___| 99: não sabe / sem informação. Idade |___|
Diabetes |___| 0: não |___| 1: sim |___| 99: não sabe / sem informação

HAS 0: não 1: sim 99: não sabe / sem informação

Alergia 0: não 1: sim 99: não sabe / sem informação

Outros|_____|

Internamentos 0: não 1: sim 99: não sabe / sem informação

Causa (s) |_____|

V. ANTECEDENTES FAMILIARES:

Hanseníase na família 0: não 1: sim 99: não sabe |_____| Número de casos

Hanseníase na residência|_____| 0: não 1: sim 99: não sabe |_____| Número de casos

Parentesco com o (s) caso (s) de HANSEN 1: seu pai 2: sua mãe 3: seu filho (a)
 4: seu esposo (a) 5: outros, especificar: |_____|

V. CLASSIFICAÇÃO FINAL PARA ESTE ESTUDO

CASO CONTROLE REAVALIAR APÓS 6M

RESPOSÁVEL	PELA	AVALIAÇÃO:

DATA: ____/____/____		

XII.3. ANEXO 3 – Research Article

Research Article

MicroRNAs correlate with bacillary index and genes associated to cell death processes in leprosy.

Nadja de Lima Santana^{b, c}, Lucas Neves de Farias^{b, c}, Tainã Lago^{b, c}, Thyago Leal-Calvo^d, Paulo Roberto Lima Machado^{a, b, c}, Léa Cristina Castellucci^{a, b, c}

^a Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

^c Serviço de Imunologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

^d Laboratório de Hanseníase, Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil
Email addresses:

NLS: nlimas@hotmail.com

LNF: nfarias.lucas@hotmail.com

TSL: tataylago@gmail.com

TL-C: thyagoleal@yahoo.com

PRLM: prlmachado@uol.com.br

LCC: leacastel@hotmail.com

§Corresponding author: Léa Cristina Castellucci. Address: Rua João das Botas, S/Nº, 5º andar, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Serviço de Imunologia. Salvador, Bahia, Brazil. 40.110-160. Tel.: (071) 3283-8114/8116. E-mail: leacastel@hotmail.com

Running headline: MiRNAs, leprosy phenotypes, apoptosis, autophagy, bacillary index

Abstract

Mycobacterium leprae infects skin and peripheral nerves causing a broad of clinical forms. MicroRNAs (miRNAs) control immune mechanisms such as apoptosis, autophagy as well as to target genes leading to abnormal proliferation, metastasis, and invasion of cells. Herein we evaluated miRNAs expression for leprosy phenotypes in biopsies obtained from patients with and without reactions. We also correlated those miRNAs with both, bacillary index (BI) and genes involved in the micobacteria elimination process. Our results show a significant increase in the miR-125a-3p expression in paucibacillary (PB) patients vs multibacillary (MB) subjects ($p = 0.007$) and vs reversal reactions (RR) ($p = 0.005$), respectively; a higher expression in patients with erythema nodosum leprosum (ENL) vs MB without reactions ($p = 0.002$). Furthermore, there was a positive correlation between miR-125a-3p, miR-146b-5p and miR-132-5p expression and BI in patients with RR and ENL. These miRNAs were also correlated with genes such as ATG12 (miR-125a-3p), TNFRSF10A (miR-146b-5p), PARK2, CFLAR and STX7 (miR-132-5p). All together we underpin a role for these miRNAs in leprosy pathogenesis, influencing mechanisms such as apoptosis and autophagy in skin. The miR-125a-3p might have a distinct role associated with PB phenotype and ENL in MB patients.

Key words: Leprosy, microRNAs, Phenotypes, Bacillary Index, Apoptosis, Autophagy

1. Introduction

Leprosy or Hansen's disease is an infectious and contagious disease, with many different dermatoneurological clinical outcomes comprising a spectrum with a chronic evolution. It still constitutes an important public health problem in Brazil, making it the second country in number of cases in the world [1]. *M. leprae* infection evolves according to the specific immune response of the host against the bacillus. Thus, disease progression depends on the ability of mycobacteria to form a safe environment for replication during the initial interaction with host cells [2]. This immune response creates a spectrum that expresses different clinical forms, ranging from the indeterminate form that either self-heal, or migrate into a milder disease up to more severe forms [3-5]. The Ridley & Jopling classification (1966), divide subgroups within the spectrum according to clinical, immunological, histopathological and bacteriological criteria, into two polar forms: tuberculoid-tuberculoid (TT) and lepromatous-lepromatous (LL) and the three borderline subgroups: borderline tuberculoid (BT), borderline borderline (BB), borderline lepromatous (BL) [6]. Moreover, sudden acute inflammatory episodes known as leprosy reactions (LR) may occur during the disease evolution, mainly during specific treatment with multidrug therapy (MDT) [3, 7]. The two main types of LR are: Type 1 or reverse reaction (RR), observed mainly in borderline forms of leprosy; being one of the main causes of neuritis in leprosy [8-9]; and the Type 2 reaction, or erythema nodosum leprosum (ENL), occurs predominantly in the polar LL and borderline lepromatous (BL) form [9]. Both reactions are the source of several disabilities and deformities that have a major impact in the patient's quality of life causing severe psychological damage [10-11]. Although most individuals are naturally resistant to *M. leprae* [12-13], a percentage of exposed people develop the disease [14]. A combination of environmental factors, bacillus burden and human genetic susceptibility factors are required to lead to clinical

leprosy. Advances in molecular techniques identified a number of genes and their variants related to risk factors in developing leprosy [15]. Among these gene elements are transcription regulators such as microRNAs (miRNAs) [16-21]. MicroRNAs are small noncoding RNA molecules that control gene expression by interacting with mRNAs in practically all biological processes. By base-pairing to mRNAs, miRNAs can inhibit the translation or increase mRNA turnover. For that reason, miRNAs are widely involved in important immune response mechanisms, such as the activation of pathways signaled by Toll-like receptors (TLRs) and NF κ B [22]. In this work, we evaluated the expression of some key miRNAs in the TLR pathways in biopsies from leprosy individuals, with and without LR. We show here miRNAs associated with leprosy phenotypes and correlated with BI, as well as relevant genes for the processes of cell death in biopsies of patients with LR.

2. Material and methods

2.1. Patient recruitment and clinical data. Following Brazilian's Ministry of Health guidelines all subjects were diagnosed and classified according to Ridley-Jopling criteria after clinical dermato-neurological evaluation and data from histopathology and bacillary index. We have also used the WHO PB and MB classification in order to organize the data bank and to perform correlations and statistical analysis. Twenty-eight skin biopsies from leprosy patients of both sex (7 PB, 7 MB, 6 RR and 8 ENL), and age mean 45.89 ± 16.30 were collected from March 2018 to June 2020 in the reference centers for treatment of leprosy at Hospital Universitario Edgard Santos and the Couto Maia Institute, both located in Salvador, Bahia, Brazil. We selected patients at the initial diagnosis, before starting MDT treatment. Especially in the case of LR patients, we only selected those who arrived at the clinic still free of immunosuppressive drugs such as prednisone and

thalidomide to avoid the bias of recruiting immunomodulated subjects. Patients that finished MDT treatment and did not developed reactions were classified as PB and MB only. Written informed consent was obtained from all patients after approval of the study by the Ethics Committee from the Federal University of Bahia (CEP 2.149.677), attending the recommendations of Resolution 466/12 of the National Health Council for research with human beings and the Declaration of Helsinki.

2.2 Sample collection and RNA extraction

Lesion biopsies were collected using a 4 mm punch (4 mm punch) and preserved in a tube containing RNAlater® Solution (Ambion®) at -70°C until tissue processing. This procedure was performed by the dermatologist who treated the individuals at the Reference Units. The tissue was intensely macerated using the TissueRuptor (Qiagen) followed by TRIzol RNA isolation, according to manufacturer's instructions. The isolated RNA was resuspended in 20 µl of RNase-free water and concentration determined by optical density measurements (260nm and 280nm) using L-Quant®. Samples were stored at -70°C until use.

2.3 cDNA synthesis and evaluation of miRNA expression by quantitative RT-PCR (qPCR)

The miRNAs -146a-5p, -146b-5p, -147a, -155-5p, -9-3p, -125a-3p, -132-5p, 21-3p, hsa-let-7a-3p, -511-3p, -103a-3p and the U6snComplementary DNA (cDNA) were chosen according to their contribution to the TLR activation pathway conferring the literature and websites TargetScanHuman (release7.1-<http://www.targetscan.org/>) e miRBase (release 21-<http://www.mirbase.org/>). cDNA was obtained using the miRCURY LNA™ RT Kit (QIAGEN), following the manufacturer's guidelines. Briefly, a reaction mix with the following components was added to an eppendorf tube: 2µl of 5x miRCURY RT

Reaction Buffer, 4.5µl of RNase-free water, 1µl of 10x miRCURY RT Enzyme mix and 0.5µl of UniSp6 RNA Spike-in. 2µl of the sample (at 5ng/µl) and 8µl of the RT reaction master mix were added to a reaction plate, making a final volume of 10µl per well. The samples were incubated in a thermocycler (Applied Biosystems) and cycled as follows: (I) 60 minutes at 42°C, (II) 5 minutes at 95°C and (III) Hold 4°C. The gene expression was performed using qPCR, through the miRCURY LNA SYBR Kit. Samples were prepared in duplicates as follows: 5µl of 2x miRCURY LNA SYBR Green Master mix, 0.05µl of ROX Reference Dye, 1µl of PCR primer mix and 1µl of RNase-free water. A final product of 10µl was used for each reaction containing 3µl of the diluted cDNA template (1:5) and 7µl of the reaction mix. The amplification conditions followed the following cycling (I) 2 minutes at 95°C, (II) 10 seconds at 95°C, (III) 60 seconds at 56°C (IV) for 40 cycles following the melting curve curve.

2.4 cDNA synthesis and gene expression of PARK2, ERBB2, BCL2, TNFRSF10A, ATG12, CFLAR, STX7 and VEGFA.

Reverse transcription reactions were performed using the commercially available High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), starting from 10µl of total RNA and using the MultiScribe Reverse Transcriptase enzyme, according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was carried out using the GeneAmp PCR System 9700 as follows: 25°C for 10 minutes, 37°C for 120 minutes, 85°C for 5 minutes, finally cooling at 4°C; and adjusted to 5ng/µl. Pre-designed TaqMan® assays containing specific primers and probes for *PARK2*, *ERBB2*, *BCL2*, *TNFRSF10A*, *ATG12*, *CFLAR*, *STX7* and *VEGFA* genes were pre-designed by Applied Biosystems®. The mRNA levels within each sample were normalized to the level of the house-keeping gene Beta-actin. qRT-PCR individual reactions were prepared from 2 µl of cDNA, 0.5 µl of each assay, 5 µl of TaqMan Universal Mastermix® and 2.5 µl of RNase-DNase free water in a final

volume of 10 μ l. All samples were run in duplicate, and the output level reported as the average of the two samples. Amplification conditions included: 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes, and 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute on the 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

2.5 Statistical analysis.

The microRNAs expression were normalized using the RefFinder program (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>), whose algorithm integrates three other computational programs (geNorm, Normfinder and BestKeeper) to compare and classify the candidate reference genes tested among samples using the Delta-Ct comparative method. Statistical data regarding miRNAs and clinical forms were generated by Welch's t test. For the chosen genes data were analyzed by comparing the threshold cycle (Ct), according to the equation $2^{-\Delta\Delta CT}$ where $\Delta\Delta CT$ is the ΔCT value of each individual less the median ΔCT of the control group (normal skin of our biorrepository). Analysis of BI, genes and miRNAs were performed through the Spearman's Correlation test, using GraphPad Prism8. Differences were considered significant when the p value was below 0.05 ($p < 0.05$).

3. Results:

miR-125a is differentially expressed between clinical forms of leprosy. Table 1 provide clinical and demographic data from patients enrolled in this study. The miR-125a-3p was differentially expressed between the samples with significantly higher expression in the PB group as compared with MB (logfc=1,59, p=0,007). PB patients had also a higher expression when compared with RR subjects (logfc=1,66, p=0,005). Conversely, this miRNA was also more expressed in ENL patients compared to MB without reactions

(log₂fc=1,73, p = 0.002), Table 2. There were no differences by comparing all patients without reactions (PB + MB) versus patients with reactions (RR + ENL), data not shown.

MicroRNAs are correlated with bacillary index (BI) in patients with leprosy reactions.

Regarding the BI we observed a positive correlation between miRs 125a-3p (r= 0.8, p= 0.002), 132-5p (r= 0.7, p= 0.042) and 146b-5p (r= 0.7, p= 0.006) and the LR group (Figures 1A, 1B and 1C, respectively), but not in patients without reactions (data not shown).

The miRNAs correlated with BI are also correlated with cell death genes. While the miR-125a correlates with the *ATG12* gene in PB group (r= -0.9, p= 0.006), the miR-146b-5p is negatively correlated with *TNFRSF10A* gene in patients with reactions (r= -0.6, p= 0.034). In addition, also in LR patients, miR-132 is negatively correlated with *PARK2* (r= -0.8, p= 0.015), *CFLAR* (r= -1,0, p= 0.0004) and *STX7* (r= -0.7, p= 0.036) genes, Figure 2A-2E, respectively.

4. Discussion

The miR-125a-3p higher expression in PB when compared to MB subjects allows us to hypothesize a possible role for this miR as a factor controlling leprosy in early stages of infection, since PB individuals have a more efficient immune response and less bacillus dissemination than occurs in MB. Members of the miR-125 family play a crucial role in host's immune defense, regulating cell differentiation, proliferation, apoptosis and response to specific stimuli such as IFN [23-25]. Our data is in agreement with Salgado *et al.*, 2018, that showed that miR-125b is downregulated in LL subjects and also with another study that documented a differential expression of this miR in leprosy patients [19].

Interestingly, we also observed a negative correlation between miR-125a-3p and *ATG12* in PB patients. The essential autophagy protein ATG12 is a positive mediator of mitochondrial apoptosis. Data show that Atg12 directly regulates the apoptotic pathway by binding and inactivating prosurvival Bcl-2 family members, including Bcl-2 and Mcl-1 [26], miRNAs that affect the expression of ATGs also influences different phases of autophagy, that goes from induction until lysosomal fusion and degradation. Multiple miRNAs have been reported to participate in the ATG5-ATG12-ATG16L and LC3-PE conjugation systems regulating the elongation of autophagosomes [27]. Autophagy was differentially regulated in T-lep and L-lep patients. In this case, T-lep skin lesion cells showed an upregulation of genes associated with increased autophagosome formation. In contrast, in L-lep skin lesion cells, *BCL2* represented a hindrance to autophagy together with an inhibition of the autophagic flux, restored via IFN- γ treatment. These data suggest that autophagy activation enhances mycobactericidal activity in skin cells, whereas impaired autophagy contributes to an increase in bacillary load [28]. Taken together, it is possible that a higher expression of miR-125a-3p in the PB biopsies we observed could be a contributing factor to a more efficient apoptotic response in T-lep, leading to a milder disease phenotype.

Conversely, miR-125a-3p was also more expressed in subjects with ENL when compared to MB subjects without reactions. Consistent with this, in a model using *M.tuberculosis* (Mtb) the increasement of miR-125a-3p expression inhibited the activation of autophagy and antimicrobial effects against Mtb in manner dependent on TLR2 and MyD88 in macrophages [29]. In another study associated with human cancers, miR-125a was observed to increase the invasive potential in urothelial carcinomas [30]. Data such as these draw attention to mechanisms linked to dissemination and metastasis processes that could justify the action of this miR in ENL, a systemic disease

characterized by disseminated deposits of *M. leprae* antigens. Consonant with this, we also observed that in the LR individuals there was a positive correlation between the bacillary index (BI) and the expression of miR-125a-3p. ENL has a different immune regulation in relation to PB. The role of miR-125a here may be different and mediated by different triggers, with two possible explanations: a) The increased expression of miR-125a in ENL would inhibit mechanisms of cell death promoting metastasis, here reflected in the correlation with a high BI; b) Alternatively, this correlation would reflect an increment of miR-125a “attempting” to regulate autophagy and contain the spread of the bacillus. However, to test these hypotheses a functional investigation are needed.

The miR-146b-5p plays an essential role in down-regulating pro-inflammatory cytokine production and cell proliferation, thereby modulating the intensity of the inflammatory response [31]. Previous studies have suggested that miR-146a links the innate immune response to oncogenic transformation [32-34] and, in mice, miR-146a deficiency has been associated with chronic dysregulation of NF- κ B signaling, producing a phenotype with features of myeloid malignancy [34] (Zhao *et al.*, 2011). Considering these findings, it is possible that the correlation observed between this miR and the BI reflects a contribution from miR-146b-5p to the antigenic spreading of *M. leprae* observed under leprosy reactions. TNFRSF10A and TNFRSF10B are cell surface receptors that bind to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and mediate the extrinsic pathway of apoptosis [35]. Thus, our finding that miR-146b-5p inhibits TNFRSF10A suggests that this could be implied in an impairment of *M. leprae* killing, favoring the spreading of bacilli and their antigens in leprosy lesions.

The miR-132 has been proposed as a regulator of neuronal structure and function, being implicated, for example, in neuropathic pain after chronic constriction injury and spared nerve injury [36-38]. *M. leprae* affect nerves, causing disabilities that are more

frequent during reactions. We believe that the correlation observed between this marker and BI reflects a possible role of miR-132 in the course of reactions, which may influence the neural damage observed in some cases. In addition, miR-132 was correlated with important genes for the response to *M.leprae* in these patients - *PARK2*: PARKIN or Parkinson's disease gene is a ubiquitin ligase with a well-established role in mitophagy. PARKIN-mediated ubiquitination leads to the autophagic targeting of *M. tuberculosis* and is essential for inhibition of mycobacterial replication in macrophages [39]. Previous data from our group show that there is a signature for RR in the blood, comprising genes mainly related to the innate immune responses, including type I IFN components, autophagy, parkins and Toll like receptors. In addition, *PARK2* was differentially expressed in the ENL group, corroborating with data that fragments of killed bacteria may continue the characteristic inflammatory process of both reactional episodes leading to the nerve and tissue damage [40]; *CFLAR*: This is a caspase-like protein but lacks catalytic activity. It regulates apoptosis, necroptosis, autophagy, and inflammation [41]. It depending on the inflammatory context, these mechanisms lose homeostasis, increasing cell death and consequently tissue and nerve damage, raising the release of PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) and DAMPs (damage-associated molecular patterns), in patients who develop reactions; *STX7*: *STX7* influences vesicle trafficking to lysosomes, including phagosome-lysosome fusion [42]. It is possible that a downregulation *STX7* may influence delivery of *M.leprae* phagosomes to lysosomes of macrophages. Adding to that, *STX7* is also expressed in cytotoxic T lymphocytes and data showed that downregulation of this gene leads to impaired cytotoxic T lymphocyte-mediated killing, impacting the cytolytic activity of human T lymphocytes [43]. All together, we might think that a downregulation of this gene could spoil the bacilli retrenchment, favouring spread and further increase the inflammatory process.

The data provided in this article underpins the role of miRNAs with immunological and clinical parameters of leprosy, reinforcing fine epigenetic mechanisms regulating disease pathogenesis. Further studies will be important to substantiate these data, providing prognostic markers and potential therapeutic targets for a better management of this disease in the future.

Declarations

Ethics approval and consent to participate:

The study has been approved by the Ethical Committee of the Hospital Universitário Prof. Edgar Santos, Federal University of Bahia, number 2.149.677. All patients read and signed an informed consent form.

Competing interests:

The authors declare that they have no competing interests.

Funding:

National Institute of Science and Technology in Tropical Diseases, Brazil (Nº 573839/2008-5) and CAPES by granting scholarships.

Authors' contributions:

PRM diagnosed, treated and included the patients in the study. NLS and LNF collected the samples and extracted the RNA from the patients. NLS and LNF performed the gene expression experiments. NLS and TL-C analyzed the data. LCC supervised the samples processing and wrote the manuscript. Supervised the data and manuscript preparation. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements:

We thank the staff of out patients leprosy clinics from Hospital Universitário Professor Edgard Santos and the Couto Maia Institute for the logistical support in the sample collection, Dr. Rosângela Cunha for the clinical care and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) for supporting this research. We also thank the Fundação Maria Emília Freire de Carvalho for aid this manuscript publication.

Table 1. Demographic, clinical and laboratory characteristics of the leprosy patients.

Demographic and Clinical Features	Patients without reactions (N=14)	Patients with reactions (N=14)	P Value
Age, mean (SD), years	48 ± 17	44 ± 16	NS
Sex, %			
Male	8/14 (57)	9/14 (64)	NS
Paucibacillary (PB), %			
Tuberculoid (TT)	3/7 (43)	0/0 (0)	
<i>Borderline</i> Tuberculoid (BT)	4/7 (57)	1/6 (17) RR	NS
Multibacillary (MB), %			
<i>Borderline Borderline</i> (BB)	1/7 (14)	4/6 (67) RR	.05*
<i>Borderline</i> Lepromatous (BL)	1/7 (14)	1/6 (17) RR e 1/8 (13) ENH	NS
Lepromatous (LL)	5/7 (71)	7/8 (88) ENH	NS
Patients with leprosy reactions, %			
Reversal reactions (RR)		6/14 (43)	
Erythema nodosum leprosum (ENL)		8/14 (43)	
Bacillary Index, median, (IQ)	0 (0-4,3)	2,5 (0,2-4,7)	NS

Abbreviations: **IQ**, interquartile; **NS**, not significant; **SD**, standard deviation.

Table 2. miR-125a-3p differential expression in leprosy skin lesions

Comparison groups	log2FC	mean 1	mean 2	P-value*	95%CI lower	95%CI upper
PB vs MB	-1.59	-5.38	-6.98	0.0078	-2.67	-0.51
PB vs RR	1.66	-5.38	-7.04	0.005	0.63	2.69
ENL vs MB	1.73	-5.25	-6.98	0.0028	0.75	2.71
PB+MB vs RR+ENL	-	-	-	0.79324	-1.08796	0.840756

PB - paucibacillary; MB – multibacillary; ENL – erythema nodosum leprosum; RR- reversal reactions. Values expressed in logfc, analyzed by Welch's t test.

Legends to Figures

Figure 1. Correlation analysis between bacillary index and the relative expression of miR-146b-5p (A), miR-125a-3p (B) and miR-132-5p (C) in biopsies from LR individuals (RR + ENH). Data analyzed using the Spearman Correlation test, using the GraphPad Prism software, where $r \geq 0.7$ was considered. P values < 0.05 were considered statistically significant.

Figure 2. Correlation analysis between the relative expression of miR-125a-3p and ATG12 (A), miR-146b-5p and TNFRSF10A (B), and miR-132-5p with PARK2 (C), CFLAR (D) and STX7(E) in biopsies from LR individuals (RR + ENH). Data analyzed using the Spearman Correlation test, using the GraphPad Prism software, where $r \geq 0.7$ was considered. P values < 0.05 were considered statistically significant.

References

- [1] World Health Organization (WHO), Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy-free world. <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9435-36>, 2019 (accessed 29 August 2019)
- [2] Toledo Pinto TG, Batista-Silva LR, Medeiros RCA, Lara FA, Moraes MO. Type I Interferons, Autophagy and Host Metabolism in Leprosy. *Front Immunol* 2018; 23;9:806. doi: 10.3389/fimmu.2018.00806.
- [3] Araújo MG. Leprosy in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36(3):373-82. doi.org/10.1590/S0037-86822003000300010
- [4] Mendonça VA, Costa RD, Melo Geba, antunes CM, teixeira AL. Immunology of leprosy. *An Bras Dermatol* 2008;83:343-50. doi.org/10.1590/S0365-05962008000400010
- [5] Machado P, Abrams J, Santos S, Brennan P, Barral A, Barral-Netto M. Production of host-protective (IFN-gamma), host-impairing (IL-10, IL-13) and inflammatory (TNF-alpha) cytokines by PBMC from leprosy patients stimulated with mycobacterial antigens. *Eur J Dermatol* 1998;8(2):98-103. PMID: 9649657
- [6] Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966;34(3):255-73. PMID: 5950347.
- [7] Scollard DM, Truman RW, Ebenezer GJ. Mechanisms of nerve injury in leprosy. *Clin Dermatol* 2015;33(1):46-54. doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.07.008.

- [8] Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(2):338-81. doi: 10.1128/CMR.19.2.338-381.2006.
- [9] Nath I, Saini C, Valluri VL. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. *Clin Dermatol* 2015;33(1):90-8. doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.07.005.
- [10] Rocha-Leite CI, Borges-Oliveira R, Araújo-de-Freitas L, Machado PR, Quarantini LC. Mental disorders in leprosy: an underdiagnosed and untreated population. *J Psychosom Res* 2014;76(5):422-5. doi: 10.1016/j.jpsychores.2014.02.006.
- [11] Borges-de-Oliveira R, Rocha-Leite CI, Araujo-de-Freitas L, Queiroz DA, Machado PR, Quarantini LC. Perception of social exclusion, neuropathy, and quality of life among Hansen's disease patients. *Int J Psychiatry Med* 2015;49(3):176-86. doi: 10.1177/0091217415582173.
- [12] Souza CS. Leprosy: Clinical forms and differential diagnosis. *Medicina. Ribeirão Preto* 1997;30:325-34. doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v30i3p325-334
- [13] Talhari S, Neves RG, *Dermatologia Tropical: hanseníase, Tropical ed., Manaus, 1997.*
- [14] Alemu BW, Naafs B. Position statement: LEPROSY: Diagnosis, treatment and follow-up. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2019;33(7):1205-1213. doi: 10.1111/jdv.15569.
- [15] Fava VM, Dallmann-Sauer M, Schurr E. Genetics of leprosy: today and beyond. *Hum Genet.* 2020; 139(6-7):835-846. doi: 10.1007/s00439-019-02087-5.
- [16] Cezar-de-Mello PF, Toledo-Pinto TG, Marques CS, Arnez LE, Cardoso CC, Guerreiro LT *et al.* Pre-miR-146a (rs2910164 G>C) single nucleotide polymorphism is

genetically and functionally associated with leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; (9):e3099. doi: 10.1371/journal.pntd.0003099.

[17] Kumar S, Naqvi RA, Khanna N, Rao DN. Disruption of HLA-DR raft, deregulations of Lck-ZAP-70-Cbl-b cross-talk and miR181a towards T cell hyporesponsiveness in leprosy. *Mol Immunol.* 2011;48(9-10):1178-90. doi: 10.1016/j.molimm.2011.02.012.

[18] Liu PT, Wheelwright M, Teles R, Komisopoulou E, Edfeldt K, Ferguson B *et al.* MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. *Nat Med.* 2012; 18(2):267-73. doi: 10.1038/nm.2584.

[19] Jorge KTOS, Souza RP, Assis MTA, Araújo MG, Locati M, Jesus AMR *et al.* Characterization of MicroRNA Expression Profiles and Identification of Potential Biomarkers in Leprosy. *J Clin Microbiol.* 2017;55(5):1516-1525. doi: 10.1128/JCM.02408-16.

[20] Soares CT, Trombone APF, Fachin LRV, Rosa PS, Ghidella CC, Ramalho RF, *et al.* Differential Expression of MicroRNAs in Leprosy Skin Lesions. *Front Immunol.* 2017 25;8:1035. doi: 10.3389/fimmu.2017.01035.

[21] Salgado CG, Pinto P, Bouth RC, Gobbo AR, Messias ACC, Sandoval TV, *et al.* miRNome Expression Analysis Reveals New Players on Leprosy Immune Physiopathology. *Front Immunol* 2018;9:463. doi: 10.3389/fimmu.2018.00463.

[22] O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2011;11(3):163-75. doi: 10.1038/nri2957.

[23] Rajaram MV, Ni B, Morris JD, Brooks MN, Carlson TK, Bakthavachalu B, *et al.* Mycobacterium tuberculosis lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating

macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(42):17408-13. doi: 10.1073/pnas.1112660108.

[24] Li M, Marin-Muller C, Bharadwaj U, Chow KH, Yao Q, Chen C. MicroRNAs: control and loss of control in human physiology and disease. *World J Surg.* 2009;33(4):667-84. doi: 10.1007/s00268-008-9836-x.

[25] Sun YM, Lin KY, Chen YQ. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *J Hematol Oncol.* 2013 15;6:6. doi: 10.1186/1756-8722-6-6.

[26] Rubinstein AD, Eisenstein M, Ber Y, Bialik S, Kimchi A. The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Mol Cell.* 2011;44(5):698-709. doi: 10.1016/j.molcel.2011.10.014.

[27] Shan C, Chen X, Cai H, Hao X, Li J, Zhang Y, *et al.* The Emerging Roles of Autophagy-Related MicroRNAs in Cancer. *Int J Biol Sci* 2021;17(1):134-150. doi: 10.7150/ijbs.50773.

[28] Silva BJ, Barbosa MG, Andrade PR, Ferreira H, Nery JA, Côrte-Real S, *et al.* Autophagy Is an Innate Mechanism Associated with Leprosy Polarization. *PLoS Pathog.* 2017;13(1):e1006103. doi: 10.1371/journal.ppat.1006103.

[29] Kim JK, Yuk JM, Kim SY, Kim TS, Jin HS, Yang CS *et al.* MicroRNA-125a Inhibits Autophagy Activation and Antimicrobial Responses during Mycobacterial Infection. *J Immunol.* 2015;194(11):5355-65. doi: 10.4049/jimmunol.1402557.

[30] Ratert N, Meyer HA, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Miller K, *et al.* Reference miRNAs for miRNAome analysis of urothelial carcinomas. *PLoS One.* 2012;7(6):e39309. doi: 10.1371/journal.pone.0039309.

- [31] Perry MM, Moschos SA, Williams AE, Shepherd NJ, Larner-Svensson HM, Lindsay MA. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J Immunol* 2008;180(8):5689-98. doi: 10.4049/jimmunol.180.8.5689.
- [32] Williams AE, Perry MM, Moschos SA, Larner-Svensson HM, Lindsay MA. Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer. *Biochem Soc Trans* 2008;36(6):1211-5. doi: 10.1042/BST0361211.
- [33] Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, Yang L, Zhao JL, Kalwani M *et al.* miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med* 2011; 208(6):1189-201. doi: 10.1084/jem.20101823.
- [34] Zhao JL, Rao DS, Boldin MP, Taganov KD, O'Connell RM, Baltimore D. NF-kappaB dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(22):9184-9. doi: 10.1073/pnas.1105398108.
- [35] Li T, Su L, Lei Y, Liu X, Zhang Y, Liu X. DDIT3 and KAT2A Proteins Regulate TNFRSF10A and TNFRSF10B Expression in Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis in Human Lung Cancer Cells. *J Biol Chem*. 2015;290(17):11108-18. doi: 10.1074/jbc.M115.645333.
- [36] Arai M, Genda Y, Ishikawa M, Shunsuke T, Okabe T, Sakamoto A. The miRNA and mRNA changes in rat hippocampi after chronic constriction injury. *Pain Med* 2013 14(5):720-9. doi: 10.1111/pme.12066.
- [37] Zhang R, Huang M, Cao Z, Qi J, Qiu Z, Chiang LY. MeCP2 plays an analgesic role in pain transmission through regulating CREB / miR-132 pathway. *Mol Pain* 2015;(12)11-19. doi:10.1186/s12990-015-0015-4.

- [38] Donate PB, Alves de LK, Peres RS, Almeida F, Fukada SY, Silva TA *et al.* Cigarette smoke induces miR-132 in Th17 cells that enhance osteoclastogenesis in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2021;118(1):e2017120118. doi: 10.1073/pnas.2017120118.
- [39] Manzanillo PS, Ayres JS, Watson RO, Collins AC, Souza G, Rae CS *et al.* The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. *Nature* 2013;501(7468): 512-516. doi.org/10.1038/nature12566.
- [40] Rêgo JL, Santana NL, Aguiar ER, Queiroz IS, Carvalho LP, Machado PRL., *et al.* Serum immune markers as triggers of reactional episodes in multibacillary patients with leprosy. *Leprosy Review* 2020;91(4), 393-402. doi:10.47276/lr.91.4.393.
- [41] .Liao D. Chapter 1 - Apoptosis, necroptosis, and pyroptosis in health and disease: an overview of molecular mechanisms, targets for therapeutic development, and known small molecule and biologic modulators. *Mechanisms of Cell Death and Opportunities for Therapeutic Development* 2022;1-46. doi.org/10.1016/B978-0-12-814208-0.00008-7.
- [42] Wang H, Frelin L, Pevsner J. Human syntaxin 7: a Pep12p/Vps6p homologue implicated in vesicle trafficking to lysosomes. *Gene* 1997;199(1-2):39-48. doi: 10.1016/s0378-1119(97)00343-0.
- [43] Pattu V, Qu B, Marshall M, Becherer U, Junker C, Matti U, *et al.* Syntaxin7 is required for lytic granule release from cytotoxic T lymphocytes. *Traffic* 2011;12(7):890-901. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01193.x.